

**N° ordre : 850**

# **THESE**

présentée à

**l'Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse**

par

**Marlène COT**

en vue de l'obtention du

**DOCTORAT**

De Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingénieries

Spécialité : Microbiologie et Biocatalyse industrielles

**Etudes physiologiques de l'adaptation et de la résistance de la  
levure *Saccharomyces cerevisiae* au cours de la production  
intensive d'éthanol**

Thèse soutenue le 10 novembre 2006 à 14h, salle des thèses à l'Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse devant la commission d'examen :

M. Thierry BERGES.....	Président
M. Hervé ALEXANDRE.....	Rapporteur
M. Jean-Marie SABLAYROLLES.....	Rapporteur
M. Mostapha SALHI.....	Examineur
M. Jean-Marie FRANCOIS.....	Co-directeur
M. Laurent BENBADIS.....	Co-directeur

Cette thèse a été préparée au Laboratoire de Biotechnologie-Bioprocédés UMS-CNRS 5504, UR-INRA 792 de l'INSA de Toulouse, département de Génie Biochimique et Alimentaire.



## Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier M. Gérard Goma de m'avoir accueilli au sein du laboratoire alors qu'il en était le directeur et pour son enthousiasme pour ce projet.

Je remercie mes co-directeurs de thèse Laurent BENBADIS et Jean Marie FRANÇOIS. Ils ont su chacun leur tour me remotiver en mettant en valeur mon travail par leurs connaissances scientifiques. J'ai appris beaucoup de nos discussions, qui aurait du être plus fréquentes.

Cette thèse a été réalisée, avec les difficultés que cela a comportés, en collaboration avec l'équipe de Génie microbiologique et l'équipe de Physiologie Microbienne des Eucaryotes. Je remercie donc l'ensemble des personnes de l'équipe « fermentation » qui ont participé aux longues nuits devant le fermenteur. En particulier, je suis redevable à Carole Jouve et Stéphane Guillouet qui ont porté leur part du projet et qui ont notamment fortement contribué à finaliser la collaboration avec l'entreprise Amylum. Je remercie le « JMF's lab » pour leur soutien plus que scientifique. Merci au personnel de la plateforme Transcriptome-biopuce de Toulouse pour leurs conseils et leur contribution à l'obtention des données transcriptomiques.

Parmi, les personnes qui ont directement contribuées à ce travail, je remercie Kenza Boulahya qui, dans le cadre de son stage de DESU, a permis la mise en place des méthodes d'extraction et de dosage des lipides cellulaires. Je remercie aussi N.ROZES, qui m'a accueilli au sein de son laboratoire à l'Université Œnologique de Tarragone afin de m'apprendre les bases des analyses lipidiques.

J'ai une pensée toute particulière pour les anciens et les actuels doctorants du laboratoire avec qui j'ai partagé mes joies et mes déceptions. Que l'avenir vous soit favorable et bon courage à ceux qui suivent ! Et je remercie aussi toutes les personnes du laboratoire qui m'ont aidé à un moment ou à un autre, celles qui ont partagé mon bureau ou les pauses-café... Je remercie particulièrement Marie-Odile Loret qui m'a écoutée et épaulée dans les moments difficiles. Un grand merci à Hélène, Lidwine et Delphine avec qui j'espère avoir partagée une « relation privilégiée » dans les bons et les mauvais moments. J'ai grandement apprécié nos longues discussions à refaire nos vies et celles beaucoup moins ambitieuses mais nettement plus rigolotes.

Un grand merci à Fred pour avoir su m'écouter au moment opportun. Merci à Lucile de me faire apprécier, du haut de ces 7 mois, chaque moment de la vie.

Enfin, je tiens à dédier cette thèse aux personnes de ma famille disparues trop tôt et plus particulièrement mon frère Philippe qui me manque énormément.



## Sommaire

<b>RESUME.....</b>	<b>13</b>
--------------------	-----------

<b>INTRODUCTION GENERALE.....</b>	<b>15</b>
-----------------------------------	-----------

<b>PARTIE I : ETUDE BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>21</b>
--	-----------

<b>I. CHAPITRE 1 : Production microbienne de (bio-)éthanol .....</b>	<b>23</b>
--	-----------

<b>I.1. Contexte économique et environnemental .....</b>	<b>24</b>
<b>I.2. Les microorganismes utilisés .....</b>	<b>25</b>
<b>I.3. Les substrats utilisés .....</b>	<b>26</b>
<b>I.4. Les procédés de fermentation alcoolique utilisant des levures.....</b>	<b>27</b>
I.4.i. Fermentation type batch .....	28
I.4.ii. Fermentation type fed-batch .....	28
I.4.iii. Fermentation type continu .....	29
I.4.iv. Procédé d'étude développé au sein du laboratoire Biotechnologie Bioprocédés.....	31

<b>II. CHAPITRE 2 : Généralités sur la croissance des levures et la composition lipidique des membranes.....</b>	<b>32</b>
--	-----------

<b>II.1. Les différents types de métabolismes .....</b>	<b>32</b>
II.1.i. Métabolisme fermentaire .....	32
II.1.ii. Métabolisme oxydatif.....	33
II.1.iii. Orientation du métabolisme et effet glucose .....	33
<b>II.2. Les principaux produits de la fermentation alcoolique.....</b>	<b>34</b>
<b>II.3. Les exigences nutritionnelles .....</b>	<b>35</b>
<b>II.4. Les phénomènes d'inhibition lors de la production d'éthanol .....</b>	<b>37</b>
II.4.i. Par le substrat.....	37
II.4.ii. Par les co-métabolites produits .....	37
II.4.iii. Par l'éthanol : notion de tolérance à l'éthanol .....	38
a. Sur la croissance cellulaire .....	38
b. Sur la capacité fermentaire .....	39
c. Sur la viabilité .....	39
d. Modèle d'inhibition.....	39
e. Notion de tolérance à l'éthanol : .....	39
f. Facteur influençant la tolérance à l'éthanol .....	40
<b>II.5. Constitution et propriétés de la membrane plasmique.....</b>	<b>41</b>
II.5.i. Les différents lipides et leur rôle.....	42
a. Les acides gras et esters d'acides gras.....	42
b. Les glycérophospholipides .....	43
c. Les mono-, di- et triglycérides .....	45
d. Les stérols .....	46
e. Glycolipides et sphingolipides .....	48

II.5.ii.	Effet de la structure des lipides sur les propriétés membranaires .....	49
a.	La fluidité membranaire .....	50
b.	La perméabilité .....	51
<b>III.</b>	<b>CHAPITRE 3 : Effet de l'éthanol sur les cellules de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....</b>	<b>52</b>
<b>III.1.</b>	<b>Effet direct de l'éthanol : .....</b>	<b>52</b>
III.1.i.	Ethanol intracellulaire et extracellulaire :.....	52
III.1.ii.	Effet de l'éthanol sur les enzymes glycolytiques.....	53
III.1.iii.	Perturbation des transports et de la régulation de l'homéostasie .....	53
III.1.iv.	Effet de l'éthanol sur les membranes .....	54
<b>III.2.</b>	<b>Action indirecte et réponse de la cellule.....</b>	<b>55</b>
III.2.i.	L'éthanol comme stress cellulaire : le water stress.....	56
a.	Le glycérol .....	56
b.	Le tréhalose.....	57
c.	Effet de l'éthanol sur l'ADN et la régulation génétique.....	59
III.2.ii.	Influx et efflux de protons à travers la membrane : Rôle de l'ATPase membranaire.....	59
III.2.iii.	Modification de la perméabilité et de la fluidité membranaire.....	60
a.	La composition en acides gras .....	60
b.	La composition en stérols .....	61
c.	Les phospholipides .....	62
d.	Les protéines membranaires et autres molécules.....	62
<b>III.3.</b>	<b>Réponse transcriptomique à la présence d'éthanol.....</b>	<b>63</b>
<b>III.4.</b>	<b>Gènes impliqués dans la tolérance à l'éthanol.....</b>	<b>65</b>
<b>III.5.</b>	<b>Conclusion.....</b>	<b>67</b>

## **PARTIE II : MATERIEL ET METHODES.....69**

<b>I.</b>	<b>Fermentation .....</b>	<b>71</b>
<b>I.1.</b>	<b>Souche .....</b>	<b>71</b>
<b>I.2.</b>	<b>Milieux de culture .....</b>	<b>71</b>
I.2.i.	Milieu de conservation .....	71
I.2.ii.	Milieu riche.....	71
I.2.iii.	Milieux de préculture et de fermentation .....	71
<b>I.3.</b>	<b>Bioréacteur et conditions de culture .....</b>	<b>73</b>
I.3.i.	Préparation de l'inoculum .....	73
I.3.ii.	Préparation du bioréacteur.....	73
<b>II.</b>	<b>méthodes analytiques .....</b>	<b>74</b>
<b>II.1.</b>	<b>Caractérisation de la biomasse.....</b>	<b>74</b>
II.1.i.	Mesure de la densité optique .....	74
II.1.ii.	Détermination de la masse sèche totale.....	74
II.1.iii.	Détermination de la viabilité cellulaire .....	75
a.	Bleu de méthylène .....	75
b.	Fun 1 .....	75
II.1.iv.	Caractérisation morphologique de la biomasse .....	76
<b>II.2.</b>	<b>Dosage du glucose extracellulaire.....</b>	<b>78</b>
II.2.i.	Dosage par méthode enzymatique .....	78
II.2.ii.	Dosage par HPLC .....	78
<b>II.3.</b>	<b>Dosage glucose, éthanol, acétate, glycérol....</b>	<b>78</b>
<b>III.</b>	<b>Analyses des composants macromoléculaires .....</b>	<b>79</b>
<b>III.1.</b>	<b>Protéines : méthode du Biuret .....</b>	<b>79</b>
<b>III.2.</b>	<b>Carbohydrates .....</b>	<b>80</b>
<b>III.3.</b>	<b>ADN+ARN .....</b>	<b>80</b>
<b>IV.</b>	<b>Analyses des composants lipidiques.....</b>	<b>81</b>
<b>IV.1.</b>	<b>Extraction des lipides cellulaires .....</b>	<b>81</b>
<b>IV.2.</b>	<b>Dosage des lipides totaux par gravimétrie .....</b>	<b>83</b>
<b>IV.3.</b>	<b>Dosage des lipides par Chromatographie Couche Mince .....</b>	<b>83</b>
IV.3.i.	Solutions étalons .....	83
IV.3.ii.	Séparation des lipides neutres par CCM .....	84
IV.3.iii.	Séparation des phospholipides par CCM .....	85
IV.3.iv.	Révélation des lipides sur plaque de CCM.....	86
<b>IV.4.</b>	<b>Dosage phospholipides totaux par une méthode colorimétrique .....</b>	<b>87</b>
<b>IV.5.</b>	<b>Dosage des stérols totaux par une méthode colorimétrique .....</b>	<b>88</b>
<b>IV.6.</b>	<b>Dosage des acides gras par chromatographie gazeuse .....</b>	<b>89</b>

<b>V.</b>	<b>Analyse des composants pariétaux .....</b>	<b>91</b>
<b>V.1.</b>	<b>Extraction des parois cellulaires .....</b>	<b>91</b>
<b>V.2.</b>	<b>Dosage sucres totaux.....</b>	<b>92</b>
<b>V.3.</b>	<b>Dosage de la chitine .....</b>	<b>93</b>
<b>V.4.</b>	<b>Dosage des mannanes et des glucanes .....</b>	<b>94</b>
V.4.i.	Hydrolyse acide.....	94
V.4.ii.	Dosage par HPAEC .....	95
<b>VI.</b>	<b>Analyse du contenu en réserves intracellulaires .....</b>	<b>96</b>
<b>VI.1.</b>	<b>Lyse des cellules .....</b>	<b>96</b>
<b>VI.2.</b>	<b>Dégradation du tréhalose en unité glucose .....</b>	<b>96</b>
<b>VI.3.</b>	<b>Dégradation du glycogène en unité glucose .....</b>	<b>97</b>
<b>VI.4.</b>	<b>Dosage du glucose libéré.....</b>	<b>97</b>
<b>VII.</b>	<b>Métabolites intracellulaires.....</b>	<b>98</b>
<b>VII.1.</b>	<b>Extraction.....</b>	<b>98</b>
<b>VII.2.</b>	<b>Quantification par HPAEC Dionex.....</b>	<b>99</b>
<b>VIII.</b>	<b>Analyse des profils d'expression des gènes par l'utilisation de puces à ADN de type microarray .....</b>	<b>101</b>
<b>VIII.1.</b>	<b>Obtention des ARNm.....</b>	<b>101</b>
VIII.1.i.	Echantillonnage des cellules.....	101
VIII.1.ii.	Extraction des ARN .....	101
VIII.1.iii.	Vérification de la qualité des ARN : .....	102
<b>VIII.2.</b>	<b>Préparation des sondes et des lames.....</b>	<b>102</b>
<b>VIII.3.</b>	<b>Rétrotranscription en ADNc et marquage.....</b>	<b>103</b>
<b>VIII.4.</b>	<b>Qualité de la rétrotranscription .....</b>	<b>105</b>
<b>VIII.5.</b>	<b>Hybridation.....</b>	<b>106</b>
<b>VIII.6.</b>	<b>Lecture du signal.....</b>	<b>106</b>
<b>VIII.7.</b>	<b>Analyse des données.....</b>	<b>106</b>
VIII.7.i.	Normalisation.....	106
VIII.7.ii.	Identification des gènes différentiellement exprimés.....	106
VIII.7.iii.	Calcul du nombre de répétitions nécessaires .....	107
a.	Estimation l'erreur expérimentale moyenne .....	108
b.	Estimation du ratio seuil et du nombre de lames .....	109
VIII.7.iv.	Analyse approfondie des résultats de l'analyse transcriptomique .....	110



# **PARTIE III :CHOIX ET OPTIMISATION DE LA METHODE D'EXTRACTION NECESSAIRE A LA QUANTIFICATION DES CONTENUS INTRACELLULAIRES EN LIPIDES ..... 111**

<b>I.</b>	<b>Choix de la méthode d'extraction des lipides cellulaires .....</b>	<b>114</b>
<b>I.1.</b>	<b>Descriptif des différentes méthodes.....</b>	<b>114</b>
I.1.i.	Méthode 1 .....	114
I.1.ii.	Méthode 2 : extraction des lipides totaux sur biomasse fraîche .....	116
I.1.iii.	Méthode 3 : dite de gradient de solvant .....	117
I.1.iv.	Méthode 4 : Extraction au soxhlet .....	118
<b>I.2.</b>	<b>Critères de choix .....</b>	<b>119</b>
<b>II.</b>	<b>Validation de la méthode d'extraction aux gradients de solvant : méthode 3 .....</b>	<b>121</b>
<b>II.1.</b>	<b>Efficacité et optimisation des différentes étapes .....</b>	<b>121</b>
II.1.i.	Optimisation du nombre d'étapes et du temps d'extraction .....	121
II.1.ii.	Optimisation de l'étape de lavage .....	124
II.1.iii.	Antioxydant .....	126
<b>II.2.</b>	<b>Reproductibilité .....</b>	<b>128</b>
<b>II.3.</b>	<b>Evaluation du rendement d'extraction .....</b>	<b>130</b>
II.3.i.	Sur solution de standards seuls .....	130
II.3.ii.	Sur solution de standards en présence de cellules.....	131
<b>III.</b>	<b>Conclusion de la partie III .....</b>	<b>134</b>

# **PARTIE IV : DYNAMIQUE D'ADAPTATION DE LA LEVURE SACCHAROMYCES CEREVISIAE A SA PRODUCTION D'ETHANOL : ASPECTS MACROCINETIQUE ET MICROSCOPIQUE.....135**

<b>I.</b>	<b>Aspect macrocinétique des fermentations alcooliques de type fed-batch .....</b>	<b>137</b>
<b>I.1.</b>	<b>Suivi cinétique des fermentations alcooliques de type fed-batch .....</b>	<b>138</b>
<b>I.2.</b>	<b>Analyse des titres et des rendements à 45h .....</b>	<b>142</b>
<b>I.3.</b>	<b>Conclusion.....</b>	<b>144</b>
<b>II.</b>	<b>Analyse de la viabilité cellulaire, de la morphologie des cellules et de la composition macromoléculaire de la biomasse.....</b>	<b>145</b>
<b>II.1.</b>	<b>Analyse de la viabilité cellulaire au cours des procédés de production intensive d'éthanol .....</b>	<b>145</b>
II.1.i.	Méthode de mesure de la viabilité cellulaire .....	145
II.1.ii.	Etat des cellules pendant les fermentations alcooliques par mesure de la coloration au bleu de méthylène.....	148
II.1.iii.	Conclusion sur la viabilité cellulaire.....	149
<b>II.2.</b>	<b>Evolution de la morphologie des cellules pendant une fermentation.....</b>	<b>150</b>
II.2.i.	Accumulation de cellules brillantes au cours de la fermentation .....	151
II.2.ii.	Evolution de la répartition des différentes catégories des cellules (cellules non bourgeonnantes, cellules bourgeonnantes et bourgeons) au cours de la fermentation.....	155
II.2.iii.	Conclusion : .....	155
<b>II.3.</b>	<b>Etat de la composition macromoléculaire des cellules au cours de la production d'éthanol en mode fed-batch.....</b>	<b>157</b>
<b>III.</b>	<b>Conclusion de la partie IV .....</b>	<b>158</b>

# **PARTIE V : REPONSE TRANSCRIPTOMIQUE DES LEVURES LORS D'UNE FERMENTATION DE TYPE FED-BATCH.....161**

<b>I.</b>	<b>Présentation du plan expérimental :.....</b>	<b>163</b>
<b>I.1.</b>	<b>Choix de la fermentation et des prélèvements pour le suivi cinétique ....</b>	<b>163</b>
<b>I.2.</b>	<b>Stratégie et traitement statistique .....</b>	<b>165</b>
<b>II.</b>	<b>Analyse des résultats .....</b>	<b>166</b>
<b>II.1.</b>	<b>Description globale des changements transcriptionnels.....</b>	<b>166</b>
<b>II.2.</b>	<b>Approfondissement des tendances métaboliques et localisation cellulaire des produits des gènes sur-exprimés et sous-exprimés .....</b>	<b>170</b>
II.2.i.	Familles fonctionnelles intervenant dans l'adaptation à l'éthanol.....	170
II.2.ii.	Localisation cellulaire des produits des gènes sur-exprimés pendant la fermentation alcoolique .....	174
<b>II.3.</b>	<b>Etude détaillée des données d'expression pertinentes pour la compréhension de l'adaptation de la levure à sa production d'éthanol.....</b>	<b>176</b>
II.3.i.	Synthèse protéique réprimée et ralentissement de la croissance .....	176
II.3.ii.	La réponse aux stress et changements environnementaux : deux facteurs de transcription impliqués .....	176
II.3.iii.	Métabolisme lié aux alcools .....	178
II.3.iv.	Métabolisme des réserves : tréhalose et glycogène .....	179
II.3.v.	Métabolisme pariétal .....	180
II.3.vi.	Métabolisme lipidique .....	181
II.3.vii.	Respiration et balance redox .....	182
II.3.viii.	Homéostasie et transport cellulaire .....	182
<b>III.</b>	<b>Conclusion de la partie V .....</b>	<b>187</b>

## **PARTIE VI : ANALYSE DE LA PHYSIOLOGIE DES LEVURES AU COURS DE DEUX FERMENTATIONS CONDUISANT A DES DIFFERENCES SIGNIFICATIVES EN TITRE ETHANOLIQUE .....191**

### **I. Impact de la production d'éthanol sur l'activité glycolytique et l'accumulation de sucres de réserves des levures..... 193**

- I.1. Evolution des métabolites glycolytiques et énergétiques intracellulaires 194**
- I.2. Fuite extracellulaire de métabolites ..... 198**
- I.3. Evolution du contenu intracellulaire en sucres de réserves : tréhalose et glycogène..... 200**

### **II. Impact de la production d'éthanol sur le contenu lipidique et les structures membranaires et pariétales ..... 203**

- II.1. Impact de la production d'éthanol sur le contenu lipidique ..... 203**
  - II.1.i. Evolution du contenu cellulaire en stérols et esters de stérols..... 204
  - II.1.ii. Evolution du contenu cellulaire en phospholipides ..... 206
    - a. Phospholipides totaux..... 206
    - b. Proportions des différents phospholipides cellulaires..... 209
  - II.1.iii. Evolution des autres composés lipidiques : Glycérides, Acides gras et esters d'acides gras ..... 210
  - II.1.iv. Evolution du contenu cellulaire en lipides totaux pendant les fermentations..... 212
  - II.1.v. Evolution des compositions relatives dans les différents acides gras en fonction du degré d'insaturation et de la longueur de la chaîne ..... 214
- II.2. Impact de la production d'éthanol sur le contenu en sucres pariétaux .. 216**

### **III. Conclusion de la partie VI ..... 218**

## **CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES .....223**

### **ANNEXE ..... 225**

### **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES ..... 237**

### **LISTE DES FIGURES ..... 255**

### **LISTE DES TABLEAUX ..... 261**

### **NOMENCLATURE..... 265**

## Résumé

### Etudes physiologiques de l'adaptation et de la résistance de la levure *S.cerevisiae* au cours de la production intensive d'éthanol

Dans le cadre de l'intensification de la production d'éthanol par *Saccharomyces cerevisiae*, une stratégie de fermentation alcoolique, qui a conduit à un titre final en éthanol de 120 à 147 g.l<sup>-1</sup> (15% à 19 % v/v) en 45h, a été mise en place au sein du laboratoire. Une des caractéristiques de ce procédé est de favoriser une phase de production d'éthanol découplée de la croissance cellulaire. La performance du procédé dépend du maintien de l'activité métabolique des cellules aux fortes concentrations en éthanol pendant cette phase. Durant ce travail, l'état physiologique des levures pendant cette phase a pu être caractérisé par l'intégration de données macrocinétiques (taux de croissance, vitesse d'accumulation, rendement, productivité...), microscopiques et métaboliques. Cette étude a montré que l'accumulation de fortes concentrations en éthanol provoque chez la levure un stress environnemental et une perte de l'intégrité membranaire. Une partie du contenu intracellulaire se retrouve dans le milieu de culture. Ainsi, une part croissante de la population cellulaire du fermenteur perd toute activité métabolique. Les levures qui se maintiennent le plus longtemps dans un tel environnement sont celles qui semblent acquérir un état spécifique, proche d'un état de quiescence.

#### Mots clé :

Fermentation alcoolique, *Saccharomyces cerevisiae*, tolérance à l'éthanol, viabilité, lipides, perméabilité membranaire, physiologie

### Physiologic study on yeast *S.cerevisiae* adaptation and resistance during intensive production of ethanol

For ethanol intensive production with *Saccharomyces cerevisiae*, a specific alcoholic fermentation strategy optimised in our laboratory leads to a production of 120 to 147 g.l<sup>-1</sup> of ethanol (15 % to 19 % v/v) in 45h. At the end of the process, an ultimate phase allows production of ethanol without biomass growth. The performance of the process depends on maintaining the metabolic activity of cells exposed to high concentrations of ethanol during this phase. During this work, the yeast physiology was characterized by integration of macrokinetic (growth rate, ethanol production rate, yield, productivity...), microscopic and metabolic data. This work shows that intensive accumulation of ethanol induces an environmental stress and a loss of membrane integrity in yeast. Part of the intracellular content spreads in the culture medium. An increasing part of the cell population in the fermentor loses their metabolic activity. Yeasts that are able to remain in such an extreme environment seem to acquire a specific state, close to quiescent state.

#### Mots clé :

Alcoholic fermentation, *Saccharomyces cerevisiae*, ethanol tolerance, viability, lipids, membrane permeability, physiology



# **Introduction générale**





Depuis une dizaine d'années, l'Union Européenne a revu totalement sa politique énergétique et opte pour les énergies renouvelables. La directive 2003/30/CE vise à promouvoir l'utilisation de biocarburants présentant un double intérêt : économique (baisse de la dépendance envers les pays détenteurs des ressources fossiles, sécurité d'approvisionnement, valorisation des produits agricoles...) et écologique (énergie renouvelable, réduction des gaz à effet de serre, impact environnemental des transports...). L'éthanol produit par fermentation des sucres contenus dans des produits agricoles (betterave à sucre, blé, maïs, ...), le plus souvent par la levure *Saccharomyces cerevisiae*, fait partie des deux principales formes de biocarburants encouragées par l'Union Européenne (bio-éthanol et bio-diesel). Il est aujourd'hui très largement utilisé au Brésil, où près de 4,5 millions de véhicules légers fonctionnent avec un mélange riche en éthanol (85%). La directive européenne vise à remplacer près de 20% de la consommation européenne d'essence et de diesel par du biocarburant d'ici 2020. Il va donc falloir augmenter nos capacités de production pour atteindre 9,3 millions de tonnes de bio-éthanol d'ici 2010.

Ainsi, un effort particulier est fait sur la recherche de nouveaux procédés plus performants, notamment au niveau de la production d'éthanol par des microorganismes ou étape de fermentation. Les performances des fermentations sont dépendantes de contraintes technologiques (composition du substrat, taille de l'installation, difficulté de mise en œuvre et de récupération du produit ...) et biologiques (notamment une inhibition par le produit formé lui-même). Plusieurs stratégies ont déjà permis d'obtenir des titres en éthanol, des rendements et des productivités de plus en plus élevés : une meilleure utilisation des sucres contenus dans les substrats, des conditions de production mieux contrôlées, la conduite du procédé (batch, fed-batch, multi-étagé, continu, continu à recyclage....). Mais, l'éthanol devient, dans tous les cas, toxique pour la cellule ce qui limite l'obtention de productions à forte concentration.

L'étude présentée ici se situe dans une logique de compréhension du phénomène de tolérance à l'éthanol de la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Pour réaliser cette étude, nous avons choisi d'utiliser un procédé de type fed-batch développé au laboratoire (Alfenore *et al.* 2002) qui nous a permis d'atteindre des concentrations comprises entre 120 et 147 g.l<sup>-1</sup>. Il s'agit d'un procédé « relativement » simple sur milieu synthétique optimisé qui se caractérise par deux phases distinctes :

- Phase I : la production d'éthanol est couplée à la croissance
- Phase II : la croissance s'arrête mais la production d'éthanol continue.

Cette dernière phase présente un double intérêt. Tout d'abord, d'un point de vue industriel, la majorité des sucres consommés vont être transformés en éthanol. D'autre part, c'est l'efficacité de production pendant cette phase qui semble déterminante dans la performance du procédé. L'efficacité de production pendant cette phase est liée à la capacité pour la levure de s'adapter à l'accumulation d'éthanol.

De nombreux travaux ont déjà été réalisés pour essayer de comprendre le phénomène de tolérance à l'éthanol chez *Saccharomyces cerevisiae*. La diversité des conditions de cultures, des souches, des méthodes utilisées et enfin des phénomènes étudiés nécessite tout d'abord de préciser la **notion de tolérance** à l'éthanol. Il n'y a pas de définition universelle, ni de méthode unique pour la mesurer. La tolérance à l'éthanol sera, pour nous, la capacité de la levure à s'adapter et à résister à l'effet toxique de ce dernier, sachant que cette action peut intervenir à trois niveaux : l'inhibition de la croissance, l'inhibition de la production d'éthanol et la perte de viabilité cellulaire. La littérature est très exhaustive sur le sujet. L'abondance des données, parfois contradictoires, conduit à des hypothèses qui seront développées dans l'étude **Bibliographique (partie I)**.

Malgré l'abondance de la littérature, les mécanismes d'adaptation de la levure à des concentrations toxiques en éthanol, ne sont pas connus. Nous nous proposons ici d'aborder le problème par une nouvelle approche. Cette étude se distingue des précédents travaux sur deux points. Nous étudions l'effet de l'éthanol en condition de production et à des concentrations très élevées. Ce sont donc l'effet dynamique de la production d'éthanol par la levure *Saccharomyces cerevisiae* elle-même et le comportement des levures en fin de fermentation qui sont ici les points centraux de l'analyse et non l'effet de l'éthanol ajouté. D'autre part, le milieu a été défini pour éviter toute carence nutritionnelle, les conditions sont maîtrisées et l'accumulation de sous-produits est limitée, contrairement aux fermentations œnologiques, brassicoles ou de production d'éthanol sur milieu complexe (mélasse, ...) ...

**Mon travail a eu pour but d'apporter une compréhension au phénomène d'adaptation de la levure *Saccharomyces cerevisiae* face à sa production intensive d'éthanol afin d'identifier les processus physiologiques mis en œuvre pour résister à l'accumulation d'éthanol et atteindre des performances de production de 147 g.l<sup>-1</sup> en 45 heures.**

En utilisant les différentes compétences du laboratoire, l'étude s'est construite autour de trois niveaux d'observation. **Au niveau du fermenteur**, dans un premier temps, les données macrocinétiques permettent de quantifier les vitesses de consommation de substrat et de production de produits et d'identifier les différentes phases du processus de fermentation sur l'ensemble des cellules. **Au niveau de la cellule**, différentes populations, en terme de viabilité et de morphologie, sont mises en évidence par des analyses microscopiques quantitatives. Enfin, **à l'intérieur de la cellule**, l'analyse du profil d'expression des gènes et de la composition cellulaire en terme de lipides, de sucres pariétaux, de sucres de réserves et des principaux métabolites intracellulaires révèle le comportement physiologique des levures dans nos conditions de production intensive d'éthanol.

Les résultats expérimentaux de cette thèse ont d'abord nécessité une approche méthodologique approfondie pour obtenir des données quantitatives et fiables. Une partie importante du travail a donc été consacrée à la sélection et à la mise au point de méthodes. Pour le suivi des compositions lipidiques, les différentes méthodes testées et les critères de choix, ainsi que les améliorations apportées sont détaillées dans la **partie III**.

La **partie IV** présente le procédé de fermentation et identifie le(s) paramètre(s) le(s) plus important(s) pour la performance du procédé de fermentation à partir des données macrocinétiques obtenues pour quatre fermentations identiques à l'exception du mode d'apport de glucose, et ayant conduit à des performances variables. L'observation microscopique des levures, couplée aux données macrocinétiques, nous a aussi permis de mieux caractériser l'évolution de la biomasse au cours de ce procédé.

La réponse transcriptionnelle de la levure *Saccharomyces cerevisiae*, lors de la dynamique d'accumulation intensive d'éthanol produit au cours d'une fermentation, a été déterminée par la technologie des puces à ADN. Le suivi cinétique des profils d'expression de l'ensemble du génome, combiné aux données de la littérature, a permis de mieux cerner des cibles physiologiques potentielles de la réponse à l'accumulation d'éthanol dans nos conditions. Ces données sont analysées dans la **partie V**.

Enfin, dans la **partie VI**, l'étude se focalise sur l'évolution des contenus intracellulaires des différents lipides, des sucres de réserves et pariétaux et de certains métabolites glycolytiques et énergétiques. Le suivi de la composition cellulaire met en évidence des changements physiologiques liés à l'accumulation d'éthanol.



# **Partie I :**

## **Etude bibliographie**



Dans les contextes écologique et économique actuels, la production d'éthanol par voie biologique connaît un regain d'intérêt. Pourquoi *Saccharomyces cerevisiae* est-elle un organisme de choix pour la production d'éthanol ? Quels sont les différents procédés envisagés pour augmenter le titre final, le rendement ou la productivité ? Placée dans les bonnes conditions, avec le bon apport nutritionnel, la levure *Saccharomyces cerevisiae* peut produire jusqu'à 20 °GL (soit 20% v/v). Comme tout procédé biotechnologique, il faut veiller à éviter les inhibitions par le substrat et la formation de co-produits de fermentation. Mais l'inhibition par l'éthanol produit est un frein majeur à l'obtention d'un titre et d'une productivité élevée en éthanol. En effet, l'éthanol inhibe la croissance, la production d'éthanol elle-même et la viabilité. Après avoir défini la notion de tolérance à l'éthanol, je ferai un tour d'horizon de la littérature qui nous donne des pistes sur les perturbations cellulaires engendrées par l'éthanol et sur les changements physiologiques et moléculaires probablement mis en place par la levure en réponse à la présence d'éthanol dans son environnement.

### **I. CHAPITRE 1 : Production microbienne de (bio-)éthanol**

L'utilisation de *Saccharomyces cerevisiae* pour la production d'éthanol comme produit majoritaire a été fortement relancée suite au contexte économico-écologique actuel. En effet, cet organisme eucaryote unicellulaire et non pathogène pour l'homme représente un modèle expérimental avec de nombreux avantages (la petite taille de son génome, la facilité à le manipuler génétiquement, le séquençage de son génome en 1996 et l'abondance de la littérature disponible). De plus, depuis des siècles, les propriétés de fermentation de la levure *Saccharomyces cerevisiae* sont utilisées dans de nombreux procédés de transformation : vinification, brassage de la bière,... Son utilisation pour la production d'éthanol-biocarburant date de la fin du 19<sup>ème</sup> siècle avec l'invention de l'automobile. D'autres microorganismes, dont *Zymomonas mobilis*, sont aussi de bons producteurs d'éthanol. Une multitude de substrats d'origine végétale, à faible coût, peuvent être fermentés, du moment qu'ils contiennent une quantité importante de sucres assimilables. De plus, les outils de la génétique permettent aujourd'hui d'optimiser les rendements d'utilisation de la plante en étendant les molécules assimilables. Après comparaison des différents procédés de production, le laboratoire a choisi de travailler sur la mise au point d'un procédé, appelé bi-réacteur à membrane.

## **I.1. Contexte économique et environnemental**

La production de biocarburants permet de répondre à l'objectif stratégique de diversifier nos sources d'approvisionnement énergétique en développant une énergie renouvelable à partir de matières agricoles (biomasse) produites en Europe. En effet, l'Union européenne connaît une dépendance énergétique croissante : aujourd'hui, nous dépendons à 50 % des sources d'énergie importées et, si rien n'est fait, ce pourcentage passera à 70 % en 2030. Dès les années 1970, le souci de diversifier les sources d'énergie devient une réelle préoccupation. Les biocarburants ont tout d'abord été écartés car jugés peu rentables. Cependant, au vu de la conjoncture économique actuelle et du prix de plus en plus élevé du pétrole, l'éthanol, produit à partir de la biomasse végétale, apparaît de plus en plus attrayant et a connu un regain d'intérêt depuis les quinze dernières années. Une étude, menée par l'ADEME et le ministère de l'industrie, montre qu'à partir d'une unité d'énergie fossile 0,87 unité d'énergie est produite sous forme d'essence, contre 2,05 sous forme d'éthanol (ADEME/DIREM 2002). Les filières biocarburants bénéficient de plus de possibilités de progression significatives puisque l'amélioration des techniques utilisées, notamment lors de la fermentation et de la distillation, permettrait de porter ce bilan énergétique de 2,05 à 3,3-3,5 d'ici 2009, alors que les marges de progression sont moindres pour l'essence. L'étude montre aussi que pour chaque litre d'essence remplacé par un litre d'éthanol, les émissions de gaz à effet de serre seraient réduites de 75 % par rapport à ce qu'aurait produit ce litre d'essence. L'utilisation d'éthanol permettrait donc de réduire nos émissions de gaz à effet de serre, conformément aux engagements pris dans le cadre du Protocole de Kyoto.

De nombreux progrès ont été réalisés pour la réduction du coût des étapes des procédés de production d'éthanol à partir de la biomasse (cf. Figure 1), notamment au niveau de l'étape de pré-traitement (cf. Figure 1). La distillation, qui était au départ une étape coûteuse, a aussi été fortement améliorée (Wyman 2001). Les efforts de recherche se portent sur l'amélioration de l'étape de fermentation, notamment par la recherche d'organismes ou de souches plus résistantes aux différents stress rencontrés lors de la fermentation alcoolique (température, faible concentration en glucose, haute concentration en éthanol...). Des efforts sont aussi faits pour diversifier les sources de carbones utilisables et améliorer les rendements, notamment avec l'utilisation des pentoses (Jeffries et Jin 2004).



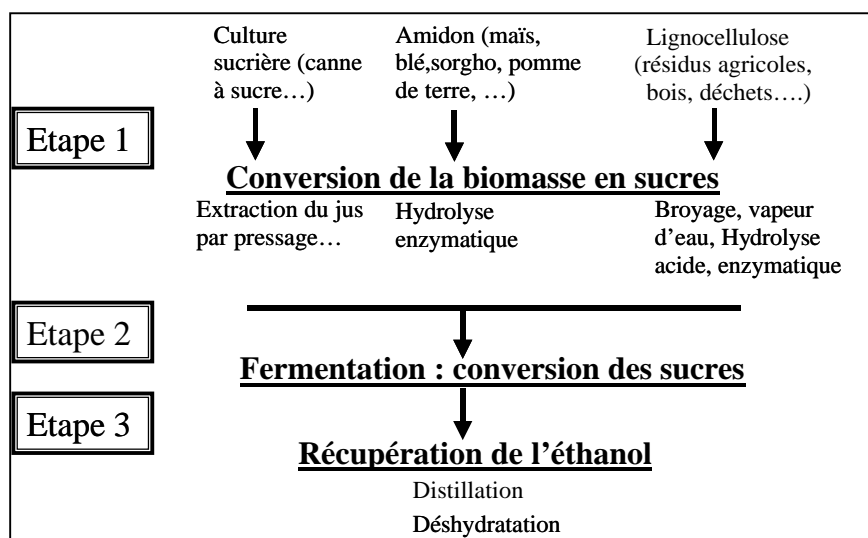


Figure 1 : Schéma regroupant les grandes étapes de l'obtention d'éthanol biocarburant à partir de biomasse végétale (Bothast et Schlicher 2005; Glazer et Nikaido 1993).

Les organismes les plus producteurs d'éthanol à partir de sucres sont les levures de types *Saccharomyces* ou *Kluyveromyces* et la bactérie *Zymomonas mobilis*. Au niveau mondial, pour le moment, le bio-éthanol est surtout produit à partir de canne à sucre au Brésil et de maïs aux USA. Le Brésil est le pays qui s'investit le plus dans le bio-éthanol, avec plus de 1 350 000 véhicules mixtes (qui peuvent fonctionner avec du carburant classique ou du biocarburant) (Coelho 2005). Au niveau européen, la Directive européenne 2003/30/CE fixe des objectifs de référence pour les biocarburants. Ceux-ci devront représenter 5,75% de l'essence et du gazole mis à la consommation d'ici 2010. La directive européenne 98/70/CE régit l'ajout d'éthanol dans l'essence sans modification des moteurs conventionnels : soit sous forme d'éthanol à hauteur de 5%, soit sous forme d'ETBE (Ethyl Tertio Butyl Ether : additif à l'essence sous forme d'ester d'éthanol avec l'isobutène) à hauteur de 15 %.

## I.2. Les microorganismes utilisés

Une grande variété de microorganismes produit de l'éthanol à partir de polysaccharides. Cependant peu sont réellement compétitifs en terme :

- de rendement en éthanol par rapport au substrat consommé
- de capacité fermentaire
- de tolérance à l'éthanol élevée
- d'adaptation aux conditions de fermentation

Les levures (*Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces uvarum*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Kluyveromyces sp.*) et les bactéries, comme *Zymomonas mobilis*, sont les plus utilisées, présentant chacune des avantages et des désavantages, notamment en fonction de la composition du substrat et du procédé employé. Les bactéries produisent souvent d'autres sous-produits : d'autres alcools, des acides organiques, des polyols, des cétones, ou des gaz (méthane, dioxyde de carbone, hydrogène, ...). Il existe quelques souches de *Clostridium* qui peuvent avoir de bons rendements en éthanol. Cependant, seule *Zymomonas mobilis* est considérée comme un strict producteur d'éthanol.

Dans les procédés fermentaires utilisant la levure, l'oxygène est nécessaire pour des raisons de maintenance de l'intégrité cellulaire. Des conditions aérées vont malheureusement favoriser aussi la production de biomasse. *Zymomonas* présente l'avantage d'être anaérobie stricte et donc de produire peu de biomasse mais plus d'éthanol (Kosaric et Vardar-Sukan 2001c). Elle serait au moins aussi, voire plus, tolérante à l'éthanol que *Saccharomyces cerevisiae* suivant les souches (Glazer et Nikaido 1993). *Zymomonas* est très efficace sur glucose mais produit beaucoup de sous-produits lorsque le saccharose est la source de carbone (notamment des acides organiques). *Saccharomyces cerevisiae* offre un plus large spectre d'utilisation de substrats. De plus, *Saccharomyces cerevisiae* est efficace en terme de production d'éthanol à bas pH (jusqu'à un pH de 4), ce qui évite les contaminations, alors que la stérilisation est encore nécessaire pour utiliser *Zymomonas mobilis*. L'utilisation de l'un ou de l'autre de ces microorganismes va donc dépendre du substrat, de la facilité de mise en œuvre et surtout de la rentabilité totale du procédé.

### I.3. Les substrats utilisés

Les substrats utilisables pour la production d'éthanol sont très variés : canne à sucre, blé, riz, maïs, pomme de terre, sorgho, manioc... Le choix va dépendre du coût et de la rentabilité du procédé.

Ces produits végétaux d'origine agricole contiennent des réserves de glucides sous forme d'amidon ou de saccharose. Les molécules d'amidon sont préalablement hydrolysées par voie enzymatique le plus souvent, *Saccharomyces cerevisiae* ne possédant pas d' $\alpha$ -amylase efficace. Les produits résultant sont le glucose et le fructose, facilement assimilables par *Saccharomyces cerevisiae*. Ce sont donc, en général les substrats riches en amidon et saccharose qui sont privilégiés pour la fermentation alcoolique.

Cependant, une part importante de la plante reste encore inexploitée. C'est pourquoi, depuis quelques années, il a été envisagé d'utiliser aussi la lignocellulose, souvent abondamment présente dans les végétaux. La lignocellulose se compose de molécules très résistantes qui restent cependant plus difficiles à hydrolyser en molécules assimilables par la levure. Elles sont hydrolysées soit par hydrolyse acide, soit par hydrolyse enzymatique. L'hydrolyse de la lignocellulose libère majoritairement du glucose, du galactose, du mannose, du xylose et de l'arabinose. Or, *Saccharomyces cerevisiae* assimile peu ou pas les sucres à cinq atomes de carbones comme le xylose (Kosaric et Vardar-Sukan 2001b).

Pour palier à leur déficience sur les sucres en C5, des approches d'ingénierie métabolique sont développées pour l'utilisation de composés lignocellulosiques :

- soit par intégration de gènes d'utilisation des pentoses chez des microorganismes producteurs d'éthanol : *Saccharomyces cerevisiae* (Jeffries et Jin 2004) ou *Zymomonas mobilis* (Deanda *et al.* 1996; Gunasekaran et Chandra Raj 1999)
- soit en intégrant les gènes de production d'éthanol chez des organismes possédant les enzymes pour métaboliser ces composés (Ingram *et al.* 1998).

Ces modifications génétiques sont encore peu efficaces pour l'activité fermentaire et demandent encore des améliorations. Une autre voie est l'exploration et la compréhension du métabolisme de souches de levures peu connues qui fermentent naturellement le xylose (comme *Pichia stipitis*) (Jeffries 2006).

Dans tous les cas, la production d'éthanol à partir de produits végétaux revient à une première étape d'hydrolyse en sucres monomériques facilement utilisables par le microorganisme lors de l'étape de fermentation. Le glucose, hexose majoritairement présent, peut donc servir de modèle pour les études visant à optimiser la production d'éthanol par voie microbienne (cf. figure 1)

### **I.4. Les procédés de fermentation alcoolique utilisant des levures**

Avant l'étape de fermentation, le substrat est d'abord préparé (pressage, broyage, vapocraquage, hydrolyse chimique ou enzymatique) afin d'en faire ressortir le jus qui pourra être fermenté par les microorganismes (cf. figure 1). Des fermentations rapides avec des titres et des rendements élevés en éthanol sont recherchées pour minimiser les coûts d'exploitation et l'énergie nécessaire à la distillation.

Dans cette partie, nous ne nous intéresserons qu'aux procédés technologiques de production prioritaire d'éthanol par les levures, en faisant abstraction des méthodes à usage agro-alimentaire, comme la vinification et le brassage de la bière où de nombreuses autres molécules sont également produites (glycérol, acétate, succinate, molécules aromatiques, ...). L'éthanol en tant que molécule chimique est produit principalement par trois grands types de procédés : le batch, le fed-batch (ou semi-continu) et les procédés continus. Les procédés batch et continu sont les plus utilisés à l'échelle industrielle.

### **I.4.i. Fermentation type batch**

C'est le plus simple des procédés utilisés en terme de mise en œuvre et d'investissement. Le substrat et les levures sont initialement mis dans le réacteur. Les fermentations se poursuivent en général pendant 36 à 48h (Kosaric et Vardar-Sukan 2001a). Les performances dépendent évidemment des conditions de culture et des substrats utilisés. Les rendements de conversion sont de l'ordre de 90 à 95% du rendement théorique pour une concentration finale en éthanol de 10 à 16 % (v/v) (environ 80 à 125 g.l<sup>-1</sup>) (Casey et Ingledew 1986). La productivité est en moyenne assez faible sur tout le procédé mais elle évolue tout au long de la fermentation.

Un procédé VHG (pour Very High Gravity) utilisant un substrat contenant plus de 300 g de matières solides (origine : blé) par litre de milieu avec des enzymes de saccharification, a permis d'atteindre des titres finaux maximum en éthanol de 23,8 % v/v (environ 185 g.l<sup>-1</sup>) en 130 heures (Thomas *et al.* 1993).

Pour augmenter la productivité, les levures peuvent être récupérées d'un batch sur l'autre : on parle de batch recyclé. La phase de latence peut ainsi être réduite.

### **I.4.ii. Fermentation type fed-batch**

Le fed-batch est un dérivé du batch, où le substrat est ajouté au fur et à mesure de la fermentation, afin d'éviter les inhibitions par les substrats. La production d'éthanol se déroule selon deux phases : une phase de croissance cellulaire et de production d'éthanol et une phase de production sans croissance.

Les concentrations finales en éthanol peuvent atteindre 19% (v/v) (147 g.l<sup>-1</sup>) en 48h pour *Saccharomyces cerevisiae* (Alfenore *et al.* 2002), ou 20,8 % (v/v) (environ 160 g.l<sup>-1</sup>) en 20 jours pour *Saccharomyces sake* (Hayashida et Ohta 1981).

L'éthanol peut être retiré au fur et à mesure de sa production. Ainsi et grâce à un recyclage du milieu de culture, Lu *et al.* (2003) ont atteint une productivité de 12 g d'éthanol.l<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>.

#### **I.4.iii. Fermentation type continu**

##### **Ø A un étage**

Le but est de bloquer les cellules en phase de croissance exponentielle et de production d'éthanol. Cependant, le taux de production est difficile à maintenir en raison de problèmes de stabilité du processus dans le temps (contamination, stabilité de la souche). La production d'éthanol est aussi limitée par une faible concentration en cellules et par l'inhibition par l'éthanol lui-même. La productivité dépend de l'apport en substrat ; il convient donc de trouver un optimum entre limitation et inhibition (Prensil 1983).

##### **Ø A plusieurs étages**

Plusieurs réacteurs sont mis en cascade. A chaque étage, s'effectue une phase différente de la fermentation (croissance de la biomasse, production d'éthanol...). Cette technique permet de limiter l'inhibition par les produits finaux, d'augmenter les titres de sortie en éthanol et donc la productivité (Maiorella *et al.* 1984). Une application d'un procédé continu à plusieurs étages (MCCF) conduit à la production finale de 16,7 % (environ 130 g.l<sup>-1</sup>) d'éthanol (Bayrock et Michael 2001).

##### **Ø A haute densité cellulaire et/ou recyclage de la biomasse**

Pour augmenter la densité cellulaire, et donc la productivité, des systèmes à cellules recyclées sont utilisés. Il faut cependant purger une partie des cellules pour maintenir la viabilité cellulaire. La concentration en biomasse peut atteindre jusqu'à plus de 100 g.l<sup>-1</sup> (Escobar *et al.* 2001), avec des productivités en éthanol de l'ordre de 30-40 g.l<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> (Ben Chaabane *et al.* 2006;del Rosario *et al.* 1979;Dellweg 1983;Prensil 1983).

D'autres techniques consistent à augmenter la productivité en soutirant l'éthanol au fur et à mesure de sa formation : soit par évaporation, soit par utilisation de membrane de dialyse, mais son utilisation paraît trop complexe pour une industrialisation.

Chaque type de procédé présente des avantages et des inconvénients. Les procédés discontinus sont faciles à mettre en œuvre et ont un faible coût d'investissement. Mais la productivité reste faible. Les procédés continus permettent d'avoir des productivités plus importantes mais connaissent des problèmes de contamination et de stabilité de la souche dans le temps, et de colmatage pour les procédés à cellules recyclées (cf. tableau 1).

Tableau 1 : Principaux avantages, principaux inconvénients et ordre de grandeur de la productivité atteinte par différents procédés de production d'éthanol.

	<b>Avantages</b>	<b>Inconvénients</b>	<b>Productivité g.l<sup>-1</sup>. h<sup>-1</sup></b>
<b><i>Batch</i></b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Facilité d'utilisation et de mise en œuvre</li> <li>- Coût investissement</li> <li>- Concentration finale en éthanol importante</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Phase de latence, faible productivité,</li> <li>- Temps de préparation et de nettoyage important</li> </ul>	2
<b><i>Batch recyclé</i></b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Id batch mais phase de latence raccourcie</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Temps de préparation et de nettoyage important</li> </ul>	15
<b><i>Fed-batch ou semi-continu</i></b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Idem batch</li> <li>- Limiter inhibition par le substrat</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Productivité qui reste faible</li> </ul>	2-3 <sup>(1)</sup> , 12 <sup>(2)</sup>
<b><i>continu</i></b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Gain de temps de préparation</li> <li>- Fermenteur souvent plus petit</li> <li>- Plus économique</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Problème de stabilité dans le temps : contaminations, stabilité des souches</li> <li>- Faible concentration cellulaire et en éthanol</li> </ul>	5
<b><i>Continu à haute densité cellulaire</i></b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Forte productivité</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Problème pour le recyclage des cellules (colmatage....)</li> </ul>	40 <sup>(3)</sup>
<b><i>Continu multi-étagé</i></b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Séparation des étapes donc limitation des inhibitions</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Beaucoup d'équipement</li> </ul>	12-18 <sup>(4)</sup>
<b><i>Continu recyclé à évaporation à biomasse recyclée</i></b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Limite inhibition par éthanol</li> <li>- Forte productivité</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Problème pour le recyclage des cellules (colmatage....)</li> </ul>	80 <sup>(5)</sup>

<sup>(1)</sup> (Alfenore *et al.* 2002)

<sup>(2)</sup> (Lu *et al.* 2003)

<sup>(3)</sup> (Ben Chaabane *et al.* 2006; del Rosario *et al.* 1979)

<sup>(4)</sup> (Bayrock et Michael 2001)

<sup>(5)</sup> (Cysewski et Wilke 1978)

#### I.4.iv. Procédé d'étude développé au sein du laboratoire Biotechnologie Bioprocédés

Chaque procédé présente des avantages et des inconvénients. Le choix d'un type de procédé est un compromis entre le type de substrat, le coût d'investissement et de fonctionnement, la productivité et les rendements recherchés... Le choix du laboratoire s'est porté sur un bio-réacteur bi-étagé à haute densité cellulaire (cf. figure 2) fonctionnant en continu avec *Saccharomyces cerevisiae* comme organisme producteur afin d'optimiser les rendements et la productivité tout en minimisant les volumes traités (Ben Chaabane *et al.* 2006).

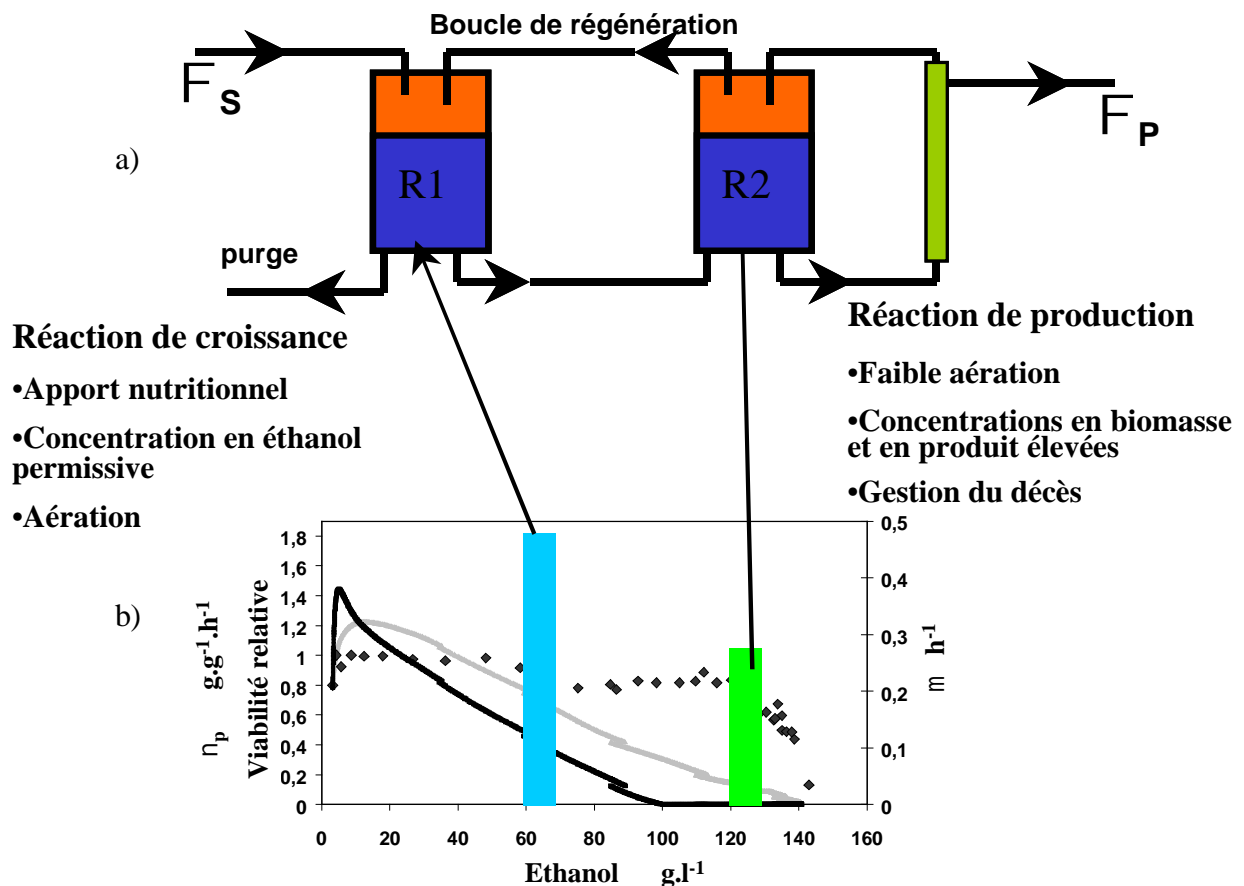


Figure 2 : a) schéma de fonctionnement du BRM (Bi-Réacteur à Membrane),  $\Phi_S$ : flux d'apport du substrat,  $\Phi_P$ : flux de sortie du produit (éthanol) ; b) résultats cinétiques d'une fermentation fed-batch avec l'évolution de la viabilité ( $\square$ ), de la vitesse spécifique de production d'éthanol  $v_p$  (—) et du taux de croissance  $\mu$  (—) en fonction de la concentration en éthanol dans le milieu.

Un premier réacteur R1 aéré vise à produire de la biomasse (Réaction de croissance). Il permet d'obtenir des microorganismes dans un état physiologique favorable à la production

d'éthanol qui s'effectuera dans le deuxième réacteur R2 micro-aéré (Réaction de production), limitant ainsi l'inhibition de la croissance par l'éthanol et l'assimilation des vitamines. R2 est couplé à un système de filtration tangentielle qui permet d'atteindre des hautes densités cellulaires. La gestion de la viabilité et de l'activité des microorganismes est réalisée par la recirculation du milieu réactionnel de R2 vers R1. L'intérêt d'un tel système est avant tout la forte productivité liée à la concentration en biomasse qui est très élevée. Il s'agit donc d'obtenir de hautes concentrations en microorganismes actifs et viables dans les conditions de concentrations en produit très élevées.

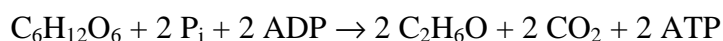
Les conditions optimales de fonctionnement de chaque étage peuvent être déduites de l'étude d'un système de type fed-batch, plus facile à mettre en œuvre. En effet, dans ce type de réaction en continu, chaque étage du réacteur est figé dans un état de fonctionnement qui se rapproche de ceux rencontrés dans une fermentation fed-batch (cf. figure 2). Dans le réacteur R1, ce sont des cellules en phase de croissance avec peu d'éthanol dans le milieu. Dans le réacteur R2, comme en fin de fermentation fed-batch, les cellules sont soumises à un environnement extrême. Les performances du procédé dépendent donc en partie de la capacité des levures à tolérer les fortes concentrations en éthanol. Dans le cadre du travail présenté dans ce manuscrit, nous nous sommes focalisés sur le comportement des levures en fin de fermentation fed-batch, afin de comprendre le phénomène d'adaptation des levures aux hautes concentrations en éthanol.

## **II. CHAPITRE 2 : Généralités sur la croissance des levures et la composition lipidique des membranes**

### **II.1. Les différents types de métabolismes**

#### **II.1.i. Métabolisme fermentaire**

Comme il n'y a pas chez la levure d'autre accepteur d'électron que l'oxygène (O<sub>2</sub>), en présence de glucose et en absence d'oxygène, l'ATP nécessaire à la cellule provient de la production d'éthanol selon l'équation suivante



Le rendement théorique en éthanol est de 0,51 g d'éthanol par gramme de glucose consommé. Cependant les réactions de maintenance, de synthèse des infrastructures cellulaires et la formation des composés secondaires (glycérol, acide acétique, substances de réserve) limitent



ce rendement à 80-90 % de sa valeur théorique. Le rendement en biomasse est de l'ordre de 0,10 g.g<sup>-1</sup> de glucose (Kappeli 1986).

En plus de l'éthanol, se forment d'autres sous-produits dont le plus important est le glycérol. Le but de la production de glycérol est de rééquilibrer la balance rédox en réponse à la production de biomasse associée à la réaction fermentaire (Nevoigt et Stahl 1997; van Dijken et Scheffers 1986).

### II.1.ii. Métabolisme oxydatif

En présence d'oxygène, le glucose est en partie dégradé en H<sub>2</sub>O et CO<sub>2</sub>, après avoir emprunté successivement la voie de la glycolyse, le cycle des acides tricarboxyliques et la chaîne respiratoire, selon l'équation bilan suivante :



Le rendement  $\gamma$ , aussi appelé P/O car c'est le nombre de moles d'ATP formées par mole d'oxygène (1/2 O<sub>2</sub>) consommée, dépend de l'efficacité de la chaîne respiratoire (Verduyn *et al.* 1991). Le rendement P/O est en théorie de 1,5 mais *in vivo*, il est inférieur, de l'ordre de 1,2 à 1,3 (van Gulik et Heijnen 1995).

Au cours du métabolisme oxydatif, une partie du glucose métabolisé génère des intermédiaires utilisés pour l'élaboration de nouvelles cellules, en consommant l'énergie fournie par la chaîne respiratoire. Le rendement théorique en biomasse en conditions oxydatives est d'environ 0,5 g/g de glucose (Kappeli 1986).

Ce processus génère beaucoup plus de moles d'ATP que lors de la fermentation.

### II.1.iii. Orientation du métabolisme et effet glucose

En anaérobiose, la levure adopte un métabolisme fermentaire indépendamment de la concentration en substrat carboné. Cependant, des conditions d'anaérobiose stricte sont difficiles à mettre en place. La micro-aération est donc plus fréquemment rencontrée.

En présence d'oxygène, c'est le substrat carboné qui va être déterminant dans l'orientation de son métabolisme. En mode batch sur glucose, la levure fermente, même en présence d'O<sub>2</sub>. En mode continu, les levures peuvent être maintenues en régime oxydatif à des taux de dilution très faibles. L'orientation du métabolisme est liée à l'efficacité glycolytique. C'est l'effet Crabtree. Certains avancent l'hypothèse que c'est le flux glycolytique qui, lorsqu'il est trop important sature la capacité respiratoire. Le surplus est réorienté vers la production d'éthanol

(Sonnleitner et Kappeli 1986). Cependant des études plus récentes montrent que le flux à travers le TCA est diminué en régime oxydo-fermentaire par rapport à un régime purement oxydatif (Frick et Wittmann 2005), concomitant à une augmentation du flux glycolytique et de la vitesse d'assimilation du glucose. La baisse du flux au niveau du TCA pourrait être due à la présence de glucose qui induit la répression d'un certain nombre de gènes codant des enzymes du TCA (Ronne 1995). D'autres gènes sont réprimés au niveau transcriptionnel par la présence de glucose :

- Gènes de la gluconéogenèse : *FBP1* et *PCK1*
- Gènes codant des enzymes impliquées dans la respiration
- Gènes codant des transporteurs et des enzymes d'utilisation des autres sucres, notamment les gènes *MAL*, *SUC* et *GAL*, d'utilisation du maltose, du saccharose et du galactose (Ronne 1995).

Bien que tout le phénomène ne soit pas encore élucidé, le passage d'un métabolisme oxydatif à oxydo-fermentaire serait régulé au niveau traductionnel, mais aussi post-traductionnel (Daran-Lapujade *et al.* 2004). Ce seraient les transporteurs de glucose qui serviraient de signal de la présence de glucose et induiraient ces régulations (Carlson 1999).

### II.2. Les principaux produits de la fermentation alcoolique

Les principaux produits de la fermentation alcoolique sont évidemment l'éthanol et le dioxyde de carbone. A eux deux, ils représentent entre 90 et 95% du glucose consommé. Le reste du glucose est utilisé lors de la croissance pour la production de biomasse et la production de sous-produits. Les sous-produits majeurs de la fermentation alcoolique sont le glycérol, le succinate et l'acétate (cf. figure 3) qui utilisent autour de 4 à 5% du substrat carboné restant (Oura 1977). En plus petites quantités, peuvent être aussi produits de l'acétaldéhyde, des acides gras (acide hexanoïque, octanoïque, décanoïque ..... ), des alcools à plus de deux carbones....

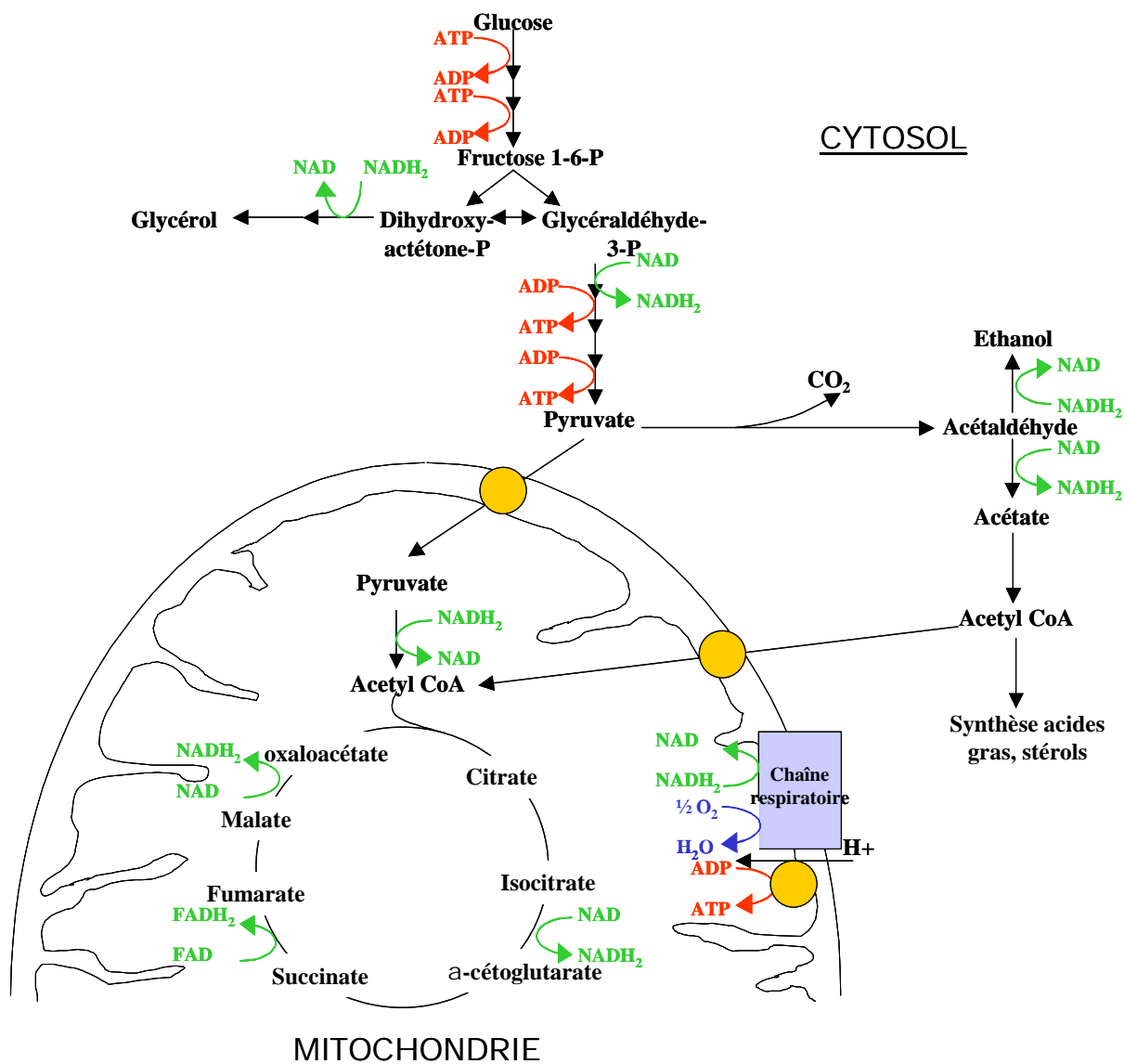


Figure 3 : Schéma récapitulatif de la voie de production d'éthanol et des voies métaboliques annexes pouvant conduire à la production de sous-produits.

### II.3. Les exigences nutritionnelles

Les fermentations alcooliques se font sur des milieux riches en sucres. *Saccharomyces cerevisiae* peut fermenter : le glucose, le maltose, le maltotriose, le tréhalose, le galactose, le mannose, le fructose, le saccharose, le raffinose.... Elle ne fermente pas le lactose, le melibiose, le cellobiose, le rhamnose, ni les sucres à 5 atomes de carbones comme le xylose ou l'arabinose (Jones *et al.* 1981)

L'**azote**, qui représente environ 10% du poids sec, joue un rôle capital car il entre dans la constitution de molécules simples (acides aminés, nucléotides, vitamines et coenzymes)

essentielles au fonctionnement cellulaire. La seule source d'azote minéral utilisable par *Saccharomyces cerevisiae* est l'ammonium (Jones *et al.* 1981).

Le **phosphore** se trouve principalement inclus dans les acides nucléiques et les nucléotides di-phosphate et tri-phosphate, mais aussi dans de nombreux constituants macromoléculaires des cellules, comme les phospholipides, ancras GPI,... Le phosphore est assimilable par la levure sous forme de phosphate par un mécanisme de transport actif (Jones *et al.* 1981).

Le **soufre** représente 0,4% du poids sec. Il peut être assimilé sous forme de méthionine ou à moindre coût de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (Jones *et al.* 1981).

Les **oligo-éléments** sont essentiels tant sur le plan structural que catalytique. Les apports minimaux en oligo-éléments nécessaires à la croissance et à la production d'éthanol par *Saccharomyces cerevisiae* ont été définis (Suzuki *et al.* 1985).

*Saccharomyces cerevisiae* est incapable de synthétiser toutes les **vitamines** dont elle a besoin. Par conséquent, il est nécessaire de lui en apporter suffisamment. Les exigences vitaminiques et les auxotrophies varient d'une souche à l'autre. Les vitamines sont pour la plupart des constituants des coenzymes ou des groupements prosthétiques d'enzymes :

- la biotine est impliquée dans le transport et l'activation du  $\text{CO}_2$ , en tant que cofacteur des enzymes de carboxylation
- le méso-inositol est un précurseur de la synthèse de lipides essentiels, tels que le phosphatidyl-inositol et les sphingolipides
- l'acide nicotinique est un constituant du NAD, du NADP
- l'acide pantothénique est un constituant essentiel du CoenzymeA
- la pyridoxine se trouve dans les sites catalytiques d'enzymes et participe à des réactions de transamination et de décarboxylation pour les métabolismes des acides aminés, des lipides et des carbohydrates.
- la thiamine est un cofacteur des réactions de décarboxylation
- l'acide p-amino-benzoïque est un coenzyme qui participe à la synthèse de purines et des pyrimidines et de certains acides aminés

L'**oxygène** joue un rôle dans la production d'éthanol. Il va avoir une influence sur la production de sous-produits. Plus le milieu va être aéré, moins il y a production de glycérol

(Alfenore *et al.* 2004;Kuriyama et Kobayashi 1993;Nissen *et al.* 2000). La production de biomasse est fortement privilégiée en conditions aérées au détriment du rendement  $Y_{\text{ethanol/substrat}}$ , mais le plus souvent en faveur d'une meilleure productivité (Alfenore *et al.* 2004;Grosz et Stephanopoulos 1990;Ryu *et al.* 1984). La présence d'oxygène aide aussi au maintien de la viabilité et donc assure une meilleure tolérance à l'éthanol, notamment par sa participation au maintien de la composition lipidique des membranes. En absence d'oxygène, il faut rajouter de l'ergostérol et des acides gras insaturés dans le milieu.

## **II.4. Les phénomènes d'inhibition lors de la production d'éthanol**

### **II.4.i. Par le substrat**

De fortes concentrations en substrat induisent une inhibition de la croissance cellulaire et de la capacité fermentaire. L'inhibition de la capacité fermentaire devient significative entre 150 et 250 g.l<sup>-1</sup> de sucres, pour une inhibition complète rapportée à 400 g.l<sup>-1</sup> de glucose, alors que l'inhibition de la croissance commence à des concentrations souvent plus faibles (Casey et Ingledew 1986). Des concentrations en sucres supérieures à 150 g.l<sup>-1</sup> inhibent généralement totalement la croissance cellulaire. Ce phénomène s'expliquerait par une inhibition des enzymes de la glycolyse (Duntze *et al.* 1967) ou par une pression osmotique élevée accompagnée d'une faible activité de l'eau (Nishino *et al.* 1985).

### **II.4.ii. Par les co-métabolites produits**

L'effet inhibiteur sur la croissance des principaux sous-produits a été testé par Maiorella *et al.* (1983) : acide acétique, acide formique, acide lactique, acétaldéhyde, glycérol... (cf. tableau 2).

Tableau 2 : Concentrations inhibant 80% de la croissance cellulaire de *Saccharomyces cerevisiae* pour les principaux sous-produits de la fermentation alcoolique (Maiorella *et al.* 1983) sur milieu synthétique glucose en mode continu pour la souche. Les sous-produits ont été rajoutés à différentes concentrations dans l'alimentation.

Sous-produit	Concentration inhibitrice g.l <sup>-1</sup>
Glycérol	450
Acide lactique	38
Acide acétique	7,5
Acétaldéhyde	5
Acide formique	2,7

L'inhibition de la croissance par les acides gras à chaîne moyenne, tels que les acides décanoïque et octanoïque, est aussi connue notamment lors de fermentations œnologiques (Alexandre *et al.* 1998). Il semble y avoir une action néfaste sur le gradient de protons transmembranaire. L'acide décanoïque induit une altération de la membrane en augmentant la fluidité et donc l'influx de proton (Alexandre *et al.* 1996).

Winter (1988) identifie les acides gras hexanoïques, octanoïques et décanoïques comme principaux inhibiteurs en conditions de fermentation de type batch sur un milieu synthétique proche de celui utilisé dans notre étude. Il estime cette inhibition à environ 1% par mg.l<sup>-1</sup> d'acide gras, sachant que l'acide décanoïque est plus toxique que l'octanoïque (Viegas *et al.* 1989). Il met aussi en évidence que la production de ces métabolites peut-être réduite de manière importante par un apport adapté en vitamines.

#### **II.4.iii. Par l'éthanol : notion de tolérance à l'éthanol**

L'effet négatif de l'éthanol se traduit par une inhibition générale de la cellule affectant aussi bien la croissance cellulaire que la capacité fermentaire (D'Amore et Stewart 1987).

##### **a. Sur la croissance cellulaire**

L'inhibition de la croissance par l'éthanol commence autour de 20 à 40 g.l<sup>-1</sup> (Casey et Ingledew 1986). Chez *Saccharomyces sp.*, la concentration inhibitrice ( $\mu=0$ ) pour la croissance est de l'ordre de 70 à 110 g.l<sup>-1</sup> (Casey et Ingledew 1986) selon les souches et les espèces.

**b. Sur la capacité fermentaire**

Pour la production d'éthanol, la concentration inhibitrice peut aller jusqu'à plus de 20% (v/v) pour *Saccharomyces cerevisiae* sake (Hayashida et Ohta 1981).

L'inhibition par l'éthanol sur la capacité fermentaire est moins importante que sur la croissance cellulaire. En effet, la production d'éthanol peut se poursuivre une fois la croissance arrêtée.

**c. Sur la viabilité**

L'effet de l'éthanol sur la viabilité cellulaire ne se fait sentir que pour des concentrations plus importantes que celles provoquant l'arrêt de la croissance (Casey et Ingledew 1986; Kalmokoff et Ingledew 1985).

**d. Modèle d'inhibition**

Plusieurs modèles peuvent être proposés pour modéliser ces inhibitions :

- modèle linéaire :  $G = G_{\max} \left( 1 - \frac{P_i}{P_{\text{crit}}} \right)$
- modèle exponentiel :  $G = G_{\max} e^{-kP_i}$
- modèle hyperbolique :  $G = G_{\max} \left( \frac{K_i}{K_i + P_i} \right)$

Où G est la grandeur étudiée : soit le taux de croissance, soit la capacité fermentaire, soit la viabilité.  $P_i$  est la concentration en éthanol et  $G_{\max}$  est cette même grandeur pour  $P_i=0$ .  $P_{\text{crit}}$  est la concentration en éthanol où la croissance est totalement inhibée. K et  $K_i$  sont des constantes d'inhibition.

Il a été décrit des relations, le plus souvent linéaires, mais aussi exponentielles pour l'inhibition de la croissance et de la capacité fermentaire (Casey et Ingledew 1986) et une inhibition de type exponentiel pour la viabilité (Kalmokoff et Ingledew 1985).

**e. Notion de tolérance à l'éthanol :**

Le phénomène de tolérance à l'éthanol est particulièrement délicat à étudier dans la mesure où il n'existe pas de technique universelle permettant de le quantifier. Certains auteurs s'appuient

sur les valeurs relatives à la croissance cellulaire (Beavan *et al.* 1982; Thomas et Rose 1979), à la vitesse spécifique de production de l'éthanol (Thomas et Rose 1979) ou encore à la viabilité cellulaire (Birch et Walker 2000; Dombek et Ingram 1987). Il est aussi possible d'étudier le flux de protons à travers la membrane plasmique (Jiménez et van Uden 1985).

**En conclusion, la tolérance à l'éthanol dépend du paramètre auquel on se réfère. Dans cette étude, la tolérance à l'éthanol sera définie comme la capacité des levures à maintenir leur viabilité à de fortes concentrations en éthanol.**

*f. Facteur influençant la tolérance à l'éthanol*

Dans ce cas, de nombreux facteurs peuvent influencer sur la tolérance à l'éthanol :

- **La température** : Plus la température de fermentation est élevée (30-40°C), plus la croissance, la viabilité et la production d'éthanol sont sensibles à l'éthanol (Aldiguier *et al.* 2004; Casey et Ingledew 1986; D'Amore et Stewart 1987).
- **L'aération** : l'augmentation de l'aération améliorerait les vitesses de production d'éthanol et diminuerait l'effet inhibiteur de l'éthanol sur la croissance en condition de production d'éthanol (Casey et Ingledew 1986). L'effet inhibiteur de l'éthanol ajouté sur le taux de croissance  $\mu$  et la vitesse spécifique de production  $v_p$  dépend aussi des conditions d'aération. Pour ces deux paramètres, l'effet inhibiteur de l'éthanol diminue en condition aérobie par rapport à l'anaérobiose (Aguilera et Benitez 1985). La présence de mitochondries et d'un métabolisme oxydatif actif dans les cellules semblent essentiels au maintien d'une plus faible inhibition par l'éthanol (Aguilera et Benitez 1985). De plus, l'oxygène est nécessaire à la levure pour la synthèse de certains composés améliorant sa tolérance à l'éthanol (acides gras insaturés, stérols....)
- **La composition du milieu** : l'apport dans le milieu et la composition cellulaire en lipides ont un impact sur la tolérance à l'éthanol, tout comme l'optimisation de l'apport en vitamines, surtout la biotine (Alfenore *et al.* 2002).

L'éthanol est connu pour avoir un effet inhibiteur sur des enzymes, notamment celles de la glycolyse (Pascual *et al.* 1988), mais c'est surtout la membrane qui semble être la plus affectée.



## II.5. Constitution et propriétés de la membrane plasmique

La levure de boulanger est constituée de protéines (45-60%), de carbohydrates (25-35%), de lipides (5-15%) et de cendres (6-9%) (kockova-kratochvilova 1990). La composition des levures en lipides varient beaucoup, en fonction de l'espèce (levure lipogène ou non), des conditions de culture, de la composition des milieux et de la méthode de mesure (Sajbidor 1997), pouvant atteindre jusqu'à 80% pour certaines levures lipogènes.

Pour *Saccharomyces cerevisiae*, les teneurs en lipides répertoriées par Rattray (1988) vont de 3,5% à 14,7% selon les souches et les conditions environnementales. Les lipides se retrouvent surtout au niveau des membranes, mais peuvent aussi se retrouver au sein de particules de lipides dans le cytosol. Ces particules de lipides sont constituées d'un noyau de triglycérides et d'esters de stérols entouré d'une mono-couche de phospholipides dans laquelle se retrouve quelques protéines (Daum *et al.* 1998).

Toutes les membranes biologiques sont structurées selon le même modèle : une bicouche de phospholipides dans laquelle sont enchâssées des molécules plus ou moins hydrophiles ou hydrophobes. Ces molécules sont d'autres lipides (stérols, glycérides,...), des protéines membranaires et des parties glucidiques pour la plupart ancrées sur des protéines ou des lipides. Les parties hydrophiles s'orientent vers l'extérieur de la membrane et les parties hydrophobes vers l'intérieur de la bicouche lipidique.

Les membranes:

- servent de barrière entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule (membrane plasmique) ou entre le cytosol et l'intérieur des différentes organelles.
- contiennent des protéines qui servent de transporteurs spécifiques, de senseurs, de facteurs de transmission de signaux et qui interviennent dans des voies de remodelage de la membrane
- exposent à leur surface des récepteurs qui participent au processus de reconnaissance.

## II.5.i. Les différents lipides et leur rôle

### a. *Les acides gras et esters d'acides gras*

Les acides gras les plus présents chez la levure sont les acides gras comportant 16 et 18 atomes de carbone. Le nombre de carbones est généralement pair et compris entre 10 et 20. Néanmoins, des acides gras avec un nombre impair d'atomes de carbone et des acides gras allant de 6 à 26 atomes de carbone ont été identifiés plus rarement (Daum *et al.* 1998). Les acides gras insaturés les plus fréquemment rencontrés sont : le C14:1 (cis 9), le C16:1 (cis 9), le C18:1 (cis 9), le C18:2 (cis 9,12), le C18:3 (cis 9, 12, 15) (Pour les noms des acides gras se rapporter au tableau 3). Les C16:1 et C18:1 représentent environ 80-90% des acides gras totaux et les C16:0 et C18:0 entre 15 et 20%. Le reste est souvent inférieur à 1% (Arnold 1980).

On peut aussi rencontrer d'autres types d'acides, comme l'acide cyclopropène et l'acide cyclopropane, acides gras avec chaînes carbonées ramifiées mais en très petites quantités par rapport aux autres décrits ci-dessus.

Ils existent sous forme libre dans les cellules mais sont le plus souvent engagés dans des liaisons esters au sein des phospholipides, des mono-, di-, triglycérides et des esters de stérols, ou des liaisons amides dans le cas des sphingolipides. Les acides gras sont donc parmi les premières molécules essentielles à la structuration cellulaire. L'acide gras le plus répandu dans la famille des triglycérides est souvent l'acide palmitique (C16:0), alors que pour les esters de stérols, l'acide palmitoléique (C16:1) et l'acide oléique (C18:1) sont souvent présents en grande quantité.

Les teneurs des différents acides gras varient selon les conditions de culture mais aussi selon le genre et l'espèce pour des cultures réalisées dans les mêmes conditions. Le profil en acides gras peut ainsi être utilisé en taxonomie (Rozès 1992).

La présence d'oxygène est essentielle à la synthèse d'acides gras insaturés. Il intervient au niveau de l'ajout d'une insaturation sur un ester CoA d'acide gras saturé par une désaturase (Ole1). L'apport en acide oléique dans le milieu est essentiel pour une croissance en anaérobiose (Parks 1978).

Tableau 3 : Nom commun et systématique des différents acides gras saturés et insaturés présents chez la levure.

	Nombre carbones : nombre insaturation	Nom commun	Nom systématique
Saturés	6:0	Ac. caproïque	Ac. hexanoïque
	8:0	Ac. caprylique	Ac. octanoïque
	10:0	Ac. caprique	Ac. decanoïque
	12:0	Ac. laurique	Ac. dodécanoïque
	14:0	Ac. myristique	Ac. tétradécanoïque
	16:0	Ac. palmitique	Ac. hexadécanoïque
	18:0	Ac. stéarique	Ac. octadécanoïque
	20:0	Ac. arachidique	Ac. eicosanoïque
Insaturés	14:1 (cis9)	Ac. myristoléique	Ac. cis $\Delta^9$ tétradécanoïque
	16:1 (cis9)	Ac. palmitoléique	Ac. cis $\Delta^9$ hexadécénoïque
	18:1 (cis9)	Ac. oléique	Ac. cis $\Delta^9$ octadécénoïque
	18:2 (cis9,12)	Ac. linoléique	Ac. cis $\Delta^{9,12}$ octadécadiénoïque
	18:3 (cis9,12,15)	Ac. linolénique	Ac. cis $\Delta^{9,12,15}$ octadécatriénoïque

### b. Les glycérophospholipides

Sept glycérophospholipides (phospholipides) différents sont majoritairement rencontrés chez *Saccharomyces cerevisiae* (cf. figure 4). Ce sont les constituants essentiels des membranes biologiques. Ce sont eux qui forment la bicouche lipidique de la membrane plasmique. La partie polaire est à l'extérieur de la bicouche et la partie hydrophobe est à l'intérieur. Ils représentent entre 25 et 65% des lipides totaux et se répartissent comme indiqué dans le tableau 4. Sont aussi présents en faible quantité les intermédiaires de la synthèse de phospholipides.

Les glycérophospholipides sont de la forme décrite dans la figure 4 :

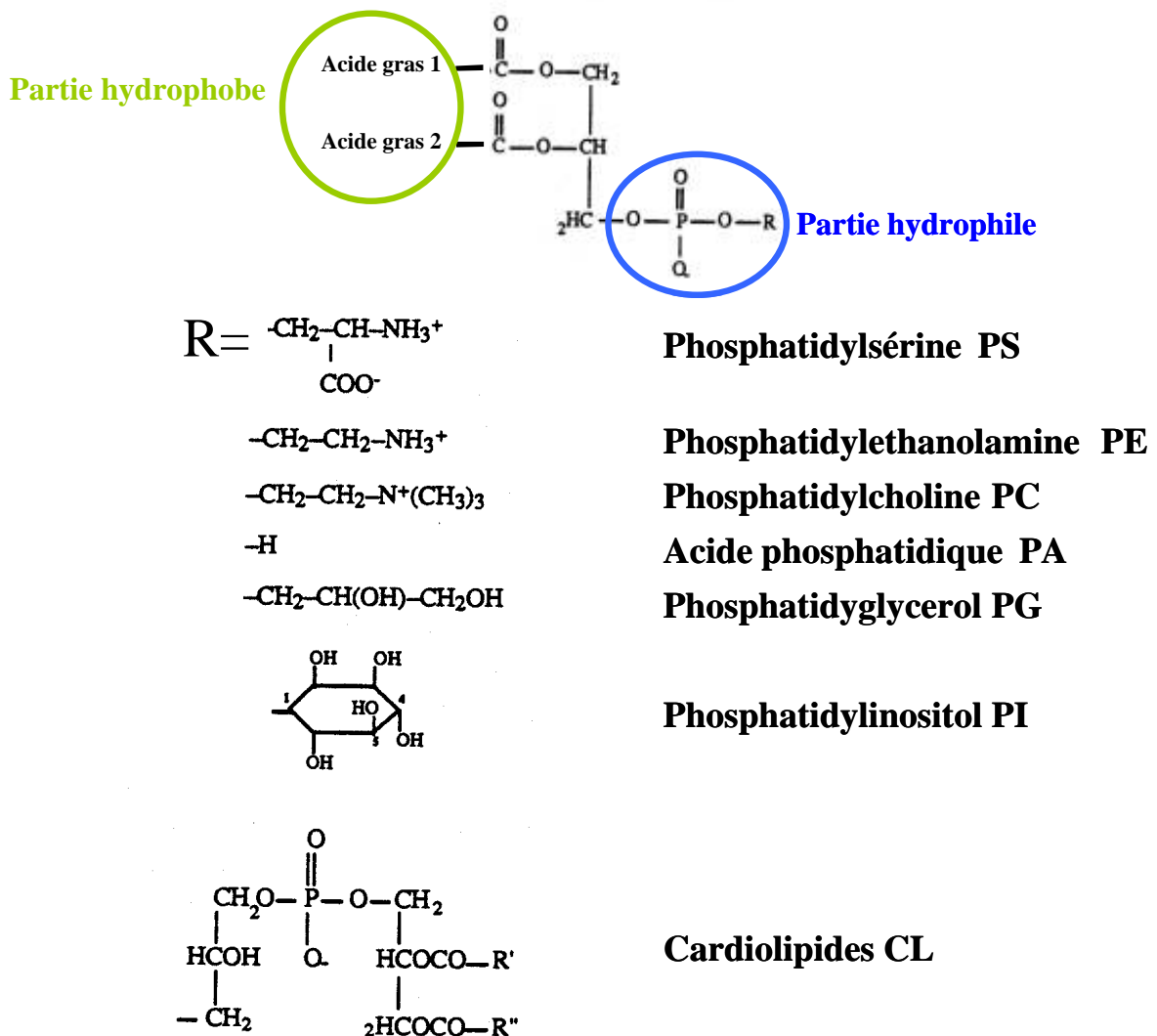


Figure 4 : Structure des différents phospholipides.

Les interactions entre phospholipides et protéines et entre phospholipides et stérols influencent la structure et l'activité de la membrane. Suivant le type de phospholipides, les parties polaires sont chargées différemment, donc la membrane va être plus ou moins chargée suivant sa composition en phospholipides. La choline et l'éthanolamine donnent une charge globale neutre (swittérion), alors que l'acide phosphatidique, le phosphatidyl-glycérol et la phosphatidyl-sérine ont une charge négative (anion). La phosphatidyl-choline est fréquemment le phospholipide le plus abondant (cf. tableau 4).

Tableau 4 : Teneur relative moyenne des différents phospholipides par rapport aux phospholipides totaux.

<b>Phospholipides</b>	<b>% des phospholipides totaux</b>
<b>Phosphatidylcholine PC</b>	<b>20-50</b>
<b>Phosphatidylethanolamine PE</b>	<b>15-40</b>
<b>Phosphatidylinositol PI</b>	<b>10-40</b>
<b>Phosphatidyls érine PS</b>	<b>5-15</b>
<b>Phosphatidylglycerol PG</b>	<b>&lt; 3</b>
<b>Autres (cardiolipides ...)</b>	<b>&lt; 20</b>

Le phosphatidyl-inositol est un phospholipide essentiel probablement pour son rôle dans la signalisation cellulaire et comme senseur membranaire (Daum *et al.* 1998). Le phosphatidyl-inositol participe à la synthèse des ancres GPI pour l'ancrage de nombreuses protéines et à la synthèse des sphingolipides.

La phosphatidyl-éthanolamine, la phosphatidyl-choline et le phosphatidyl-inositol sont très présents dans la membrane plasmique et dans l'ensemble des membranes subcellulaires. Par contre, la phosphatidyl-éthanolamine et les cardiolipides sont majoritairement présents dans la membrane plasmique et la membrane interne des mitochondries (Daum *et al.* 1998).

### *c. Les mono-, di- et triglycérides*

Il s'agit d'une molécule de glycérol estérifiée par un, deux ou trois acides gras.

Le triglycéride est le glycéride le plus présent dans les levures (en général entre 7 et 15% des lipides totaux pour *Saccharomyces cerevisiae*). Son rôle n'est pas clairement connu : il est supposé servir de stockage d'énergie et d'acides gras. Il est présent au sein de la membrane plasmique et des membranes vacuolaires chez *Saccharomyces cerevisiae* (Ratray 1988). Une partie peut s'accumuler sous forme de granules. En cas d'accumulation de triglycérides, ils peuvent servir de précurseurs aux phospholipides (Ratray 1988).

Les mono- et di-glycérides sont normalement beaucoup moins présents dans les extraits lipidiques des levures mais sont des constituants essentiels car intermédiaires dans la synthèse des triglycérides et des phospholipides.

*d. Les stérols*

Les stérols sont des constituants essentiels des membranes biologiques. Ils représentent en général entre 0,1 et 1% du poids sec cellulaire. L'ergostérol présent à plus de 90% est le principal stérol libre chez la levure (Ratray 1988). Les autres sont essentiellement des intermédiaires entre le squalène et l'ergostérol (notamment le lanostérol). Ces stérols libres se retrouvent essentiellement au niveau des membranes, avec un ratio stérols:phospholipides généralement compris entre 0,4 et 0,8. Les stérols se caractérisent par une structure plane au niveau des cycles, avec à une extrémité (en  $\beta$  du C3) une fonction hydroxyde non estérifiée et de l'autre (C24) une longue chaîne carbonée qui peut interagir avec les chaînes carbonées des acides gras des phospholipides (cf. figure 5). Les stérols libres ont probablement un rôle structural au sein des membranes, et en modifient ainsi considérablement les propriétés. Ils influenceraient ainsi la fluidité et la perméabilité de la membrane, et par la même occasion l'activité des enzymes membranaires. Les stérols vont condenser les phospholipides et donc diminuer la fluidité de la membrane (Bottema *et al.* 1985).

Les teneurs en stérols de la levure vont dépendre de la disponibilité de l'oxygène, des conditions de culture dont la température, du milieu de culture et bien sur de la souche utilisée (Parks 1978). Le principal facteur influençant la composition en stérols est l'aération. L'ergostérol n'est pas synthétisé en anaérobiose, la présence d'ergostérol dans le milieu est donc essentielle pour assurer une croissance. En effet, l'oxygène intervient au niveau de (Aries et Kirsop 1977;Aries et Kirsop 1978):

- la régulation de la transcription des enzymes intervenant dans la conversion du 3-hydroxy-3methyl-glutaryl CoA en acide mévalonique
- la cyclisation du squalène en lanostérol
- la déméthylation et désaturation du lanostérol en ergostérol.

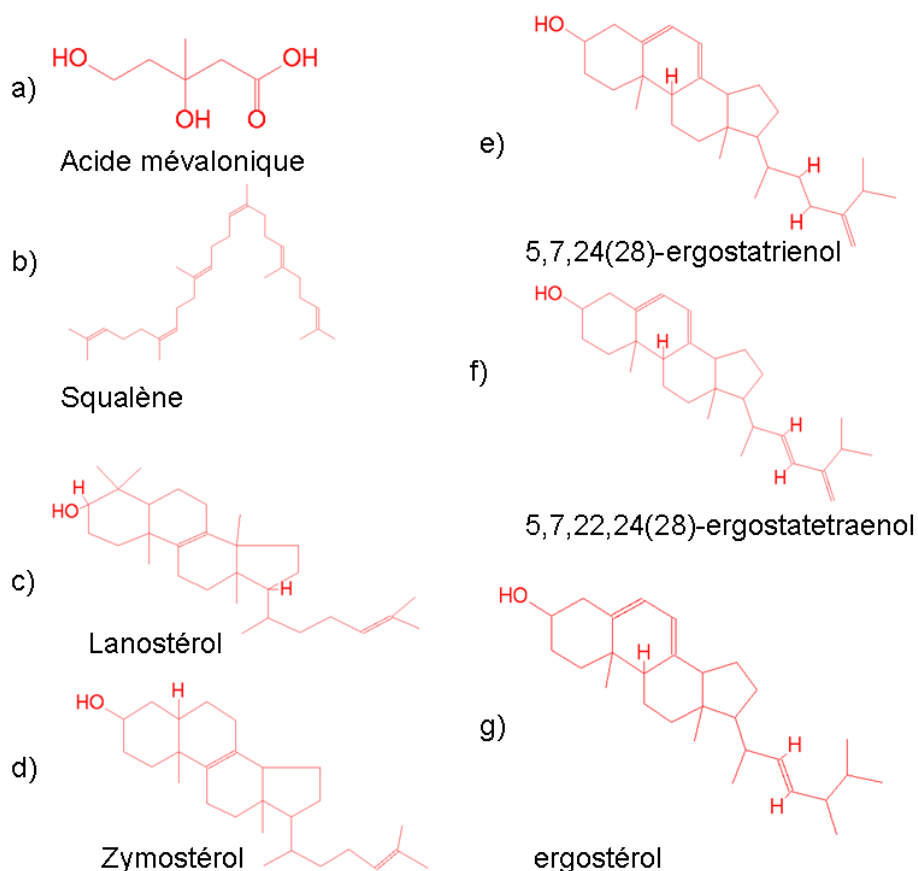


Figure 5 : Principaux intermédiaires de la voie de synthèse de l'ergostérol. Dans l'ordre de la voie de synthèse, a) acide mévalonique, b) squalène, c) lanostérol, d) zymostérol, e) 5,7,24(28)-ergostatrienol, f) 5,7,22,24(28)-ergostatetraenol, g) ergostérol.

Plusieurs stérols se retrouvent communément sous forme estérifiée avec un acide gras : essentiellement l'ergostérol, le zymostérol, le 5,7,24(28)-ergostatrienol et le 5,7,22,24(28)-ergostatetraenol. La diminution du taux de croissance semble être un facteur d'accumulation des esters de stérols chez *Saccharomyces cerevisiae*, ainsi que le passage en phase stationnaire, la sporulation, la disponibilité en oxygène, certaines carences nutritionnelles (glucose, phosphate)... (Ratray 1988; Sandager *et al.* 2002). Les esters de stérol sont essentiellement localisés dans des vésicules de stockage de lipides, mais peu ou pas dans les membranes. Cette observation suggère que les esters de stérol servent de réserves d'acides gras et d'intermédiaires de la synthèse des stérols libres, et évitent ainsi leur accumulation qui peut être toxique. La partie acide gras peut alors aussi être utilisée pour la synthèse des composants membranaires (Ratray 1988).

### e. Glycolipides et sphingolipides

Les glycolipides sont des lipides (diglycérides, stérols) présentant une ou plusieurs glycosylations à la surface de la membrane.

Les sphingolipides sont des composants essentiels des membranes des levures. Ils peuvent représenter jusqu'à 30% des phospholipides totaux et 7% de la masse de la membrane plasmique. Ils sont présents en plus faible quantité dans les mitochondries (Patton et Lester 1991). Chez la levure, ils ont la structure décrite dans la figure 6 :

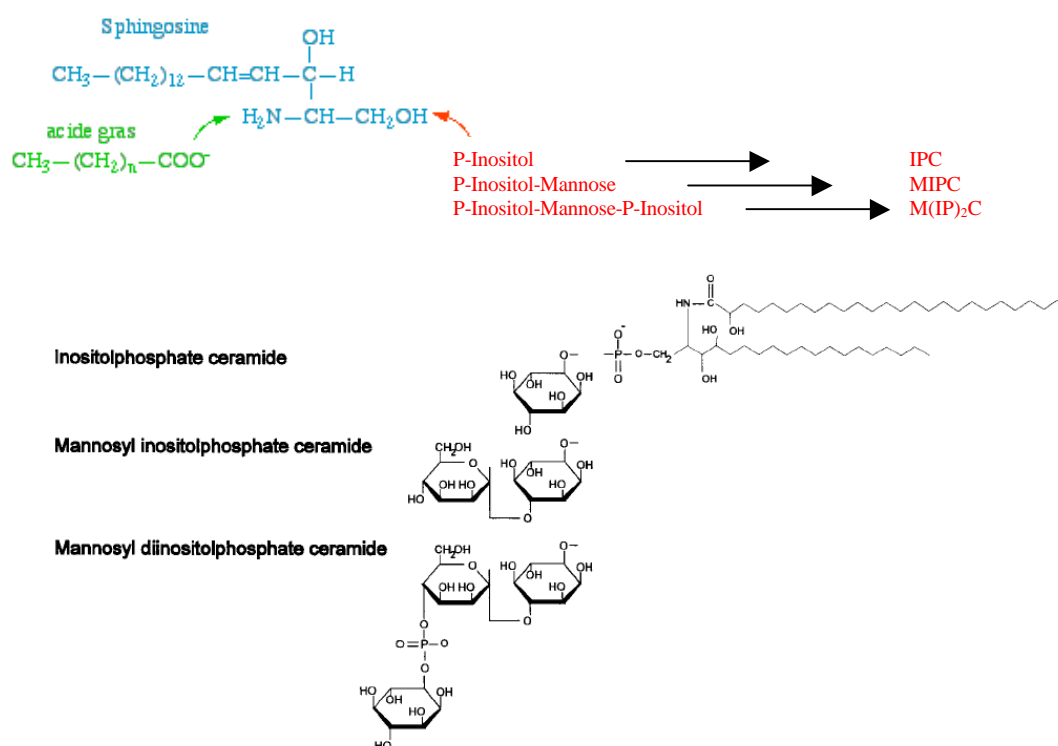


Figure 6 : Structures des principaux sphingolipides. (van der Rest *et al.* 1995)

Les sphingolipides semblent jouer d'abord un rôle structural dans les membranes au même titre que les autres lipides. Ils joueraient aussi un rôle de signal moléculaire en réponse à un choc température (Dickson *et al.* 1997; Dickson et Lester 2002). Ils seraient aussi impliqués dans les phénomènes d'endocytose et d'exocytose, de contrôle de la croissance cellulaire, de maintien de l'intégrité cellulaire et de longévité cellulaire. Associés à des stérols, les sphingolipides joueraient un rôle de médiateurs dans la transduction du signal et le bon adressage à la membrane plasmique de certaines protéines (Ex : Gas1p, Pma1p, Nce2p) (Dickson *et al.* 2006; Dickson et Lester 2002). En effet, les mannoprotéines peuvent être



ancrées à la membrane par l'intermédiaire d'une partie lipidique appelée « ancre GPI » (cf. figure 7).

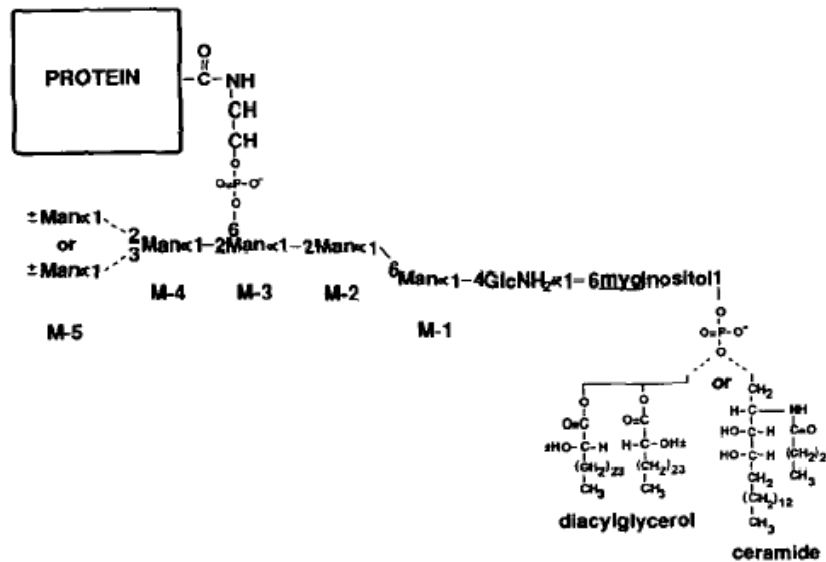


Figure 7 : Structure des ancres GPI (Glycosylated Phosphatidyl-Inositol) rencontrées pour les protéines de *Saccharomyces cerevisiae* (Fankhauser *et al.* 1993). La partie lipidique est le plus souvent un céramide. Il y a en général quatre mannoses (M1 à M4). M5 est optionnel en  $\alpha(1-2)$  ou  $\alpha(1-3)$ .

Certains sphingolipides sont aussi requis pour que l'ATPase vacuolaire soit fonctionnelle (Chung *et al.* 2003).

## II.5.ii. Effet de la structure des lipides sur les propriétés membranaires

Les membranes ne sont pas des structures rigides. La bicouche lipidique constitue à la fois une structure suffisamment solide pour maintenir l'intégrité cellulaire mais aussi assez fluide pour permettre les mouvements des protéines transmembranaires et membranaires et d'autres molécules. Les différents éléments de la membrane bougent les uns par rapport aux autres. La cohésion de la bicouche est assurée par deux types d'interactions (cf. tableau 5) :

- les liaisons hydrogènes : entre les parties polaires, soit directement entre les phospholipides, soit par l'intermédiaire de molécules d'eau
- les interactions de type Van der Waals entre les chaînes carbonées.

Tableau 5 : Nature et force des interactions au sein des membranes

Partie de la molécule	Nature de l'interaction électrostatique	Ordre de grandeur de l'énergie d'interaction
têtes polaires	Liaisons hydrogènes	5 à 30 KJ/mol
chaînes hydrocarbonées	Interaction de Van der Waals dipôle instantané/dipôle induit	1 à 5 KJ/mol

Une membrane est donc caractérisée par un équilibre entre les forces hydrophiles et hydrophobes. Ces forces dépendent de la taille et de la charge de la partie polaire, de la longueur, du nombre d'insaturations et de méthylations de la chaîne carbonée.

A la température physiologique, la structure de la membrane biologique n'est ni liquide ni solide. Cet état particulier de la matière est appelé cristal liquide (Beney et Gervais 2001) : «cristal» car l'édifice est hautement organisé et «liquide» car il confère à la membrane sa fluidité.

#### *a. La fluidité membranaire*

La fluidité de la membrane est la capacité des différentes molécules à pouvoir se déplacer les unes par rapport aux autres dans une même couche (horizontalement).

Les interactions qui stabilisent le cœur de la membrane concernent les parties apolaires des constituants membranaires, il s'agit de liaisons électrostatiques de type Van der Waals, qui sont beaucoup moins fortes que les liaisons qui unissent les têtes polaires et elles varient fortement avec la distance entre les molécules (la force de l'interaction est inversement proportionnelle à la distance puissance douze).

La nature hydrophobe de ces interactions est une barrière à la diffusion passive des ions et aux molécules polaires (Beney et Gervais 2001).

La labilité des interactions assure une fluidité plus forte au sein de la membrane qu'à l'extérieur ce qui permet le positionnement et l'activité enzymatique ou de transport des protéines intrinsèques.

Les principaux facteurs agissant sur ces interactions sont :

- la présence de chaînes insaturées car la présence de doubles liaisons principalement de configuration cis a pour effet d'écarter les chaînes hydrocarbonées et donc de diminuer les interactions de van der Waals.
- la présence de stérols : Les stérols s'intercalent dans la membrane et vont avoir tendance à en diminuer la fluidité. La configuration plane et volumineuse du noyau stéroïde et sa rigidité tend à compresser les chaînes aliphatiques des lipides

environnants ce qui augmente la force des liaisons entre ces chaînes (Bottema *et al.* 1985). Cet effet se répercute jusqu'au carbone C<sub>8</sub> des phospholipides. Au-delà de ce carbone, la courte chaîne aliphatique des stérols va avoir tendance à augmenter la fluidité entre les chaînes des phospholipides adjacentes. Cet effet est plus important lorsque la chaîne du stérol est insaturée (comme c'est le cas chez l'ergostérol qui est le principal composant stéroïde de la membrane de *S. cerevisiae* ou le stigmastérol) que lorsque la chaîne est linéaire (comme chez le cholestérol ou le campestérol). La présence d'ergostérol a donc tendance à rigidifier la membrane.

- Les lipides à longue chaîne diminuent la fluidité de la membrane : en effet, plus la chaîne aliphatique des phospholipides est longue, plus les interactions de van der Waals sont importantes et vont rigidifier la membrane.

### ***b. La perméabilité***

La perméabilité est la propriété que possède la surface cellulaire d'absorber directement des substances du milieu extracellulaire et d'y éliminer d'autres substances. Elle peut prendre deux formes.

1. La perméabilité passive ou diffusion. Elle dépend uniquement des lois physico-chimiques et ne nécessite pas l'intervention active de la cellule. Le passage d'un côté à l'autre de la membrane suit les lois de la thermodynamique. On en distingue deux types :

La diffusion simple : elle n'implique aucun transporteur spécifique et dépend du gradient de concentration, de l'épaisseur et de la composition de la membrane, de la taille de la molécule, du degré d'ionisation et de la liposolubilité : c'est le cas des molécules telles que les gaz (O<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>), H<sub>2</sub>O, des petites molécules polaires non chargées (urée, ...)

La diffusion facilitée : elle concerne la perméabilité de diverses molécules polaires (oses, ions, acides aminés) qui passent à travers la membrane plasmique sous l'effet du gradient de concentration. Ces substances sont prises en charge par des transporteurs (perméases) qui les délivrent à l'intérieur de la cellule. Il s'agit d'un mécanisme saturable.

2. La perméabilité active ou transport actif. Celui-ci implique la participation de la cellule par un apport d'énergie métabolique. Ce mécanisme permet le transport contre le gradient de

concentration. Ce transport, relativement spécifique à une molécule ou une famille de molécules, se fait par l'action d'une enzyme dont l'activité est fortement dépendante de la structure de la membrane. Le plus souvent, l'énergie nécessaire est apportée par couplage avec une molécule d'ATP (ABC transporteur, ATPase...)

Les différentes propriétés de la membrane, ainsi que leur composition lipidique sont modifiées en présence d'éthanol. La membrane est-elle la seule cible de l'action de l'éthanol ? Comment se manifeste l'effet toxique de l'éthanol sur la cellule ? Et comment va réagir la cellule ?

### **III. CHAPITRE 3 : Effet de l'éthanol sur les cellules de *Saccharomyces cerevisiae***

#### **III.1. Effet direct de l'éthanol :**

##### **III.1.i. Ethanol intracellulaire et extracellulaire :**

La tolérance à l'éthanol est en général déterminée par la concentration de l'éthanol ajouté, or il est souvent décrit que l'éthanol produit serait plus toxique que l'éthanol ajouté sur la croissance cellulaire (Casey et Ingledew 1986; D'Amore *et al.* 1990; Novak *et al.* 1981).

Une des hypothèses pour expliquer la différence de toxicité entre l'éthanol ajouté et produit est l'accumulation intracellulaire d'éthanol pendant la fermentation. Cependant, cette idée a été contredite par d'autres travaux (Dombek et Ingram 1986; Guijarro et Lagunas 1984) qui trouvent des concentrations similaires en intracellulaire et en extracellulaire. Les artefacts des travaux antérieurs seraient probablement dus à la méthodologie employée pour le dosage de l'éthanol intracellulaire.

Des travaux plus récents utilisant une méthode adaptée montrent une accumulation d'éthanol intracellulaire en début de fermentation. Les concentrations entre éthanol intracellulaire et extracellulaire s'équilibrent au fur et à mesure de l'avancement de la fermentation (D'Amore *et al.* 1988) (dès 15-20 g.l<sup>-1</sup> d'éthanol). Dombek et Ingram (1986) n'ont en effet travaillé qu'après 12 h de fermentation, moment où il n'y a plus de différence entre éthanol intra et extracellulaire. Mais D'Amore *et al.* (1988) nuancent leur conclusion, en laissant entrevoir de possibles erreurs dues à des concentrations très faibles en éthanol en début de fermentation et un faible nombre de cellules. Par contre, Guijarro et Lagunas (1984) affirment que l'éthanol pénètre au travers des membranes par simple diffusion, sans utilisation d'un transporteur. Ils

avancent plusieurs arguments pour cela : l'équilibre entre l'intérieur et l'extérieur est rapidement atteint et les vitesses d'influx et d'efflux d'éthanol sont insensibles au changement de pH, à la présence d'analogues structuraux de l'éthanol et d'inhibiteurs de protéines. L'effet de l'accumulation d'éthanol n'a donc pas pu être clairement démontré.

Une autre hypothèse pour expliquer l'effet plus toxique de l'éthanol produit est l'accumulation de sous-produits inhibiteurs pendant la fermentation et les changements de conditions de culture (limitation nutritionnelle, pression osmotique...) qui vont aussi avoir une influence sur la croissance cellulaire (Casey et Ingledew 1986).

### III.1.ii. Effet de l'éthanol sur les enzymes glycolytiques

Les enzymes les plus sensibles *in vitro* à l'éthanol semblent être : la phosphoglycérate kinase, la phosphoglycérate mutase et la pyruvate décarboxylase (Millar *et al.* 1982) pour des concentrations en éthanol inférieures à 10% (v/v). Pour les autres enzymes de la glycolyse les auteurs semblent s'accorder sur le fait qu'il n'y a pas d'inhibition significative jusqu'à pratiquement 12% (v/v) (Millar *et al.* 1982; Pascual *et al.* 1988).

Pour la majorité des enzymes glycolytiques, il semblerait y avoir une inhibition non-compétitive, c'est-à-dire que l'éthanol ne prend pas la place du substrat sur son site de fixation, mais agit de manière plus générale sur la structure de l'enzyme (Millar *et al.* 1982).

### III.1.iii. Perturbation des transports et de la régulation de l'homéostasie

En utilisant le D-xylose (analogue non métabolisable du glucose), Leao et van Uden (1982) ont étudié l'effet de l'éthanol et d'autres alcools sur le transport de glucose. Aucun alcool ne change l'affinité du transporteur. Par contre, la vitesse maximale d'assimilation décroît avec l'augmentation de la concentration en alcool selon la relation :

$$v = V_{\max}^0 \cdot e^{-kx} \frac{S}{K_m + S}$$

$V_{\max}^0$  = Vitesse maximale d'assimilation en absence d'éthanol,  $x$  = concentration en alcool,  
 $k$  = constante d'inhibition,  $K_m$  = constante d'affinité et  $S$  = concentration en substrat

De plus, il existe une corrélation entre la constante d'inhibition de chaque alcool et le coefficient de répartition entre la membrane et le tampon. Le degré d'inhibition de chaque

alcool est dépendent de la solubilité de l'alcool dans les lipides membranaires et de leur volume moléculaire (cf. figure 8). Leao et van Uden (1982) ont conclu que les alcools inhibent le transport du glucose par changement de l'environnement lipidique de la membrane. Du fait de la perturbation des membranes cellulaires par l'éthanol, les systèmes de transport s'en trouvent profondément perturbés.

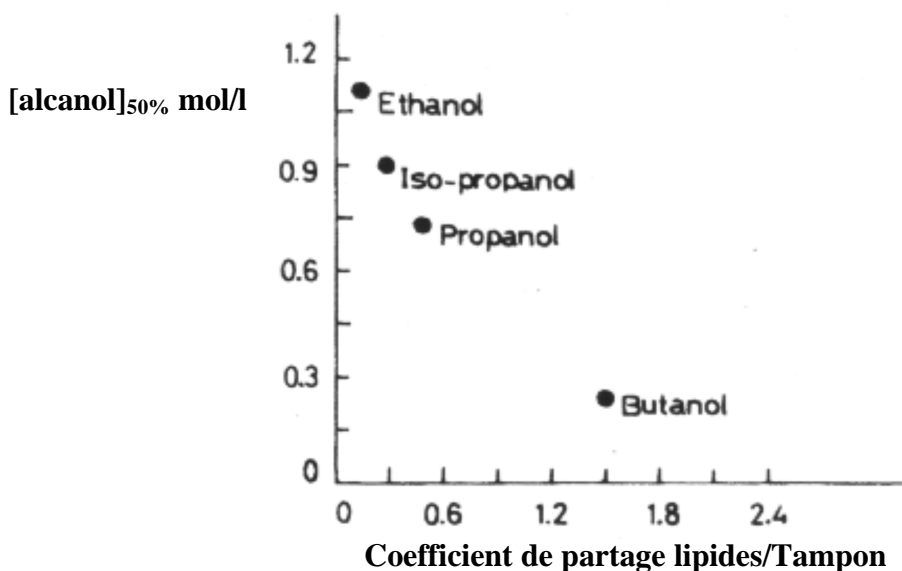


Figure 8 : Relation entre la concentration en alcool qui inhibe de 50% l'activité du transporteur du glucose et le coefficient de partage des alcools entre les membranes et le tampon utilisé pour l'expérience (Leao et van Uden 1982).

L'apport dans le milieu d'acides gras poly-insaturés (C18:2) diminue l'effet d'un « choc éthanol » sur les transports de glucose, de glucosamine, d'alanine et de lysine par rapport à un apport d'acide gras mono-insaturés (C18:1) (Thomas et Rose 1979).

En plus du transport des sucres, sont aussi affectés par la présence d'éthanol les transports d'acides aminés (Ferrerias *et al.* 1989; Garcia et Kotyk 1988) et d'ammonium (Cardoso et Leao 1992).

#### III.1.iv. Effet de l'éthanol sur les membranes

L'éthanol, comme tout alcool, est une molécule amphiphile. La fonction hydroxyle est la partie hydrophile de la molécule qui peut interagir avec les têtes polaires des phospholipides.

Parallèlement, la fonction éthyle, partie hydrophobe, peut potentiellement s'intercaler entre les chaînes aliphatiques des phospholipides. L'éthanol peut donc s'immiscer et perturber la structure de la membrane (Slater *et al.* 1993).

Les alcools linéaires causeraient des désordres au niveau de la chaîne glycérique de phospholipides dans les membranes, suggérant que les groupements hydroxyles de ces composés s'ancrent au niveau de l'interface aqueuse des lipides (Weber et de Bont 1996). Les liaisons hydrogènes formées entre phospholipides et éthanol sont moins fortes qu'avec l'eau. Ces modifications se traduisent par une augmentation de la fluidité membranaire avec des mouvements lipidiques (diffusion latérale et rotation) plus fréquents (Ghosh 1988) et par une altération du processus d'insertion de certaines protéines, nécessitant la formation de liaisons hydrogènes (Ingram et Buttke 1984). D'autre part, la pénétration de la molécule d'éthanol à l'intérieur de la bicouche augmente la polarité de cette zone normalement imperméable aux molécules polaires (Alexandre *et al.* 1994a; Slater *et al.* 1993). Ainsi, la membrane deviendrait plus perméable aux ions et autres petites molécules polaires, comme l'eau et les protons. L'éthanol aurait donc pour effet de dissiper la force protomotrice, de diminuer les interactions de van der Waals et donc d'augmenter la fluidité membranaire.

### **III.2. Action indirecte et réponse de la cellule**

L'éthanol va créer localement une baisse de l'activité de l'eau, en s'intercalant entre les têtes hydrophiles des phospholipides. L'eau devient ainsi moins disponible pour les fonctions cellulaires ce qui va créer un stress cellulaire appelé « Water stress » (Iwahashi *et al.* 1995).

La baisse de la disponibilité en eau se répercute à différents niveaux :

*Au niveau membranaire* : l'eau n'est plus disponible pour stabiliser la face extracellulaire et intracellulaire de la membrane ce qui augmente la fluidité membranaire.

*Au niveau enzymologique* : l'eau n'est plus disponible pour maintenir le site actif des enzymes et des transporteurs hydrophiles (transporteur du glucose, des acides aminés...) en conformation native, ce qui va affecter leur activité. L'activité des enzymes dont la réaction utilise directement la molécule d'eau est ainsi diminuée.

*Au niveau moléculaire* : notamment sur la configuration de l'ADN.

### III.2.i. L'éthanol comme stress cellulaire : le water stress

La molécule d'éthanol perturbe les liaisons hydrogènes responsables de la stabilité des interfaces qui séparent la bicouche lipidique et la phase aqueuse. Ces liaisons hydrogènes relient les parties hydrophiles des constituants membranaires en réseau.

Ces liaisons hydrogènes peuvent être distinguées en deux catégories suivant qu'elles nécessitent ou non l'intervention de molécule d'eau. Les liaisons hydrogènes « directes » s'établissent directement entre les têtes polaires des phospholipides tandis que les liaisons hydrogènes « indirectes » s'établissent entre deux phospholipides *via* une ou plusieurs molécules d'eau. Seules la phosphatidyl-sérine et la phosphatidyl-éthanolamine sont capables *via* leur fonction amine d'établir des liaisons hydrogènes directes, de ce fait les liaisons indirectes sont les plus répandues.

De part sa nature amphiphile, l'éthanol va monopoliser des molécules d'eau qui ne seront plus disponibles pour d'autres fonctions biologiques (Iwahashi *et al.* 1995). Le « water stress » provient de la baisse de l'activité de l'eau, au moins localement, due à la présence de molécules d'éthanol. L'activité de l'eau diminue quand la concentration en éthanol augmente ce qui va avoir une influence sur les composés hydratés de la levure comme les enzymes et la membrane (Hallsworth 1998). Les liaisons hydrogène de la membrane s'en trouvent ainsi perturbées. La perméabilité et la fluidité de la membrane augmentent allant parfois jusqu'à la lyse cellulaire (Hallsworth 1998; Kollar *et al.* 1993b).

En cas de « water stress », la cellule accumule des composés qui sont supposés protéger la structure et la fonction des autres composés cellulaires déshydratés en « remplaçant » les molécules d'eau : les polyols comme le glycérol, les acides aminés et le tréhalose (Hallsworth 1998).

#### a. *Le glycérol*

Le glycérol qui a une masse moléculaire plus faible que le tréhalose va intervenir dans les phénomènes d'ajustement osmotique (Edgley et Brown 1983). Lorsque la concentration en sucre dans le milieu extérieur est très élevée (solution hypertonique) l'eau va avoir tendance à sortir de la cellule afin de tendre vers l'équilibre osmotique des solutions. Pour contrebalancer cette perte en molécules d'eau la cellule va augmenter l'osmolarité de son milieu intracellulaire (Hallsworth 1998) en augmentant la synthèse de glycérol et en diminuant la perméabilité de la membrane pour le glycérol ce qui permet l'accumulation de glycérol dans



le cytoplasme. L'augmentation de l'osmolarité intracellulaire assure le rétablissement de la pression de turgescence et du volume cellulaire.

Le glycérol va intervenir dans des chocs osmotiques modérés lorsque l'activité de l'eau  $A_w$  atteint 0,98 (Hounsa *et al.* 1998). Le glycérol va principalement être impliqué dans les mécanismes liés à l'adaptation à l'éthanol endogène. Lors de la production d'éthanol endogène il y a augmentation progressive de la production de glycérol afin de maintenir l'équilibre osmotique des solutions, la fonction et l'intégrité des enzymes. A l'action du glycérol s'ajoute généralement la synthèse des protéines chaperonnes (les Hsp) qui sont également impliquées lors de la réponse aux chocs thermiques (Lewis *et al.* 1995) et dans le maintien de la stabilité membranaire. A de fortes concentrations en éthanol endogène et lors des chocs en éthanol exogène, l'action protectrice du glycérol sur la membrane est limitée.

### ***b. Le tréhalose***

Le tréhalose est un disaccharide non réduit d'unités glucose. Il est synthétisé par un complexe enzymatique : la tréhalose synthase, codée par quatre gènes (*TPS1*, *TPS2*, *TPS3* et *TS11*) à partir d'UDP-glucose et de Glucose-6-phosphate. Il est hydrolysé par deux voies distinctes : par une tréhalase neutre cytosolique (Nth1) (Kopp *et al.* 1993) et par une tréhalase (ath1p) dont 90% de l'activité est située dans l'espace périplasmique (Jules *et al.* 2004). Ces tréhalases sont régulées par un mécanisme de phosphorylation/ déphosphorylation catalysé par des protéines kinases AMPc dépendantes (de Virgilio *et al.* 1991).

Le tréhalose a un rôle prépondérant lors de la résistance à la déshydratation de *S. cerevisiae* (Gadd *et al.* 1987). L'accumulation de tréhalose pourrait donc être stimulée en réponse à la baisse de l'activité de l'eau.

Le tréhalose joue également un rôle prépondérant dans la protection de la cellule contre des stress environnementaux de diverses natures (thermiques, osmotiques...) (Alexandre *et al.* 1998; François et Parrou 2001; Parrou *et al.* 1997). Ces propriétés sont utilisées afin d'augmenter la tolérance de la levure aux opérations de congélation, de séchage et de réhydratation (Coutinho *et al.* 1988). Le tréhalose va intervenir lorsque l'eau n'est plus disponible pour établir des liaisons hydrogènes : ce qui est notamment le cas lorsque les molécules d'eau sont utilisées pour solubiliser l'éthanol à fortes concentrations ou bien lorsque l'activité de l'eau est minimale comme c'est le cas chez les organismes anhydrobiotiques, pour lesquels la teneur en tréhalose peut atteindre jusqu'à 20% de la masse sèche (Crowe et Crowe 1984). Le tréhalose intervient donc en conditions de stress osmotique

intense lorsqu'il ne s'agit plus seulement d'équilibrer l'osmolarité des solutions mais de compenser la chute de l'activité des molécules d'eau dans la cellule.

En absence de « water stress » l'hydratation des têtes polaires des phospholipides et la formation de liaisons hydrogènes indirectes participent à maintenir un espace entre les têtes polaires des phospholipides de manière à limiter les interactions de Van der Waals entre les chaînes aliphatiques en configuration de cristal liquide. Lorsque l'activité de l'eau est réduite, le tréhalose va se substituer à l'eau en établissant des liaisons hydrogènes entre ses fonctions OH et les groupes phosphates des phospholipides et ainsi maintenir les phospholipides en conditions optimales de fluidité (Crowe et Crowe 1984) et de stabilité (Iwahashi *et al.* 1995). Le tréhalose va donc agir directement sur la membrane afin de maintenir cette dernière en configuration de cristal liquide (Leslie *et al.* 1995).

Entre la présence d'éthanol dans l'environnement cellulaire et l'accumulation de tréhalose, il doit nécessairement exister un signal intracellulaire transducteur. Par augmentation de la perméabilité de la membrane vis à vis du gradient de protons, la présence d'éthanol dans le milieu induit une baisse du pH intracellulaire ( $pH_i$ ) (Jiménez et van Uden 1985), tout comme avec la synthèse d'acide acétique (Arneborg *et al.* 1997), d'acide décanoïque, et une élévation de température (Alexandre *et al.* 1998), c'est-à-dire la plupart des stress aboutissant à une élévation de la concentration en tréhalose. La chute du  $pH_i$  est un candidat pour être l'élément inducteur de la présence de tréhalose. Cette hypothèse fut invalidée lors de l'étude de la réponse à un stress éthanolique de mutants présentant une activité réduite de l' $H^+$ -ATPase membranaire (principale enzyme régulatrice du  $pH_i$  *in vivo*) (Alexandre *et al.* 1998).

Des analyses génétiques ont montré que les deux principaux gènes impliqués dans la synthèse du tréhalose (*TPS1*, *TPS2*) possèdent au niveau de leur région promotrice de nombreuses séquences STRE. Ces gènes sont donc inductibles en condition de stress éthanol, thermique, osmotique.... Ces séquences STRE sont la cible de facteurs de transcription spécifiques qui sont codés par deux gènes homologues *MSN2* et *MSN4* (Martinez-Pastor *et al.* 1996). Des expériences ont montré que les chocs thermiques et les chocs alcooliques avaient deux conséquences communes : la première est l'augmentation du taux en acides gras insaturés au sein de la membrane, la seconde est l'augmentation de la teneur cellulaire en tréhalose (Odumeru *et al.* 1993). Une hypothèse de travail consisterait à corrélérer ces deux phénomènes. De plus, des travaux ont montré que la sensibilité de l'activation des gènes STRE était fonction de la composition en acide gras insaturés de la membrane (Chatterjee *et al.* 2000).

*c. Effet de l'éthanol sur l'ADN et la régulation génétique*

Chez *E.coli*, l'éthanol entraîne un retard dans la synthèse des ARN, de l'ADN et des protéines, mais n'agirait pas comme un inhibiteur spécifique de ces processus (Ingram 1977).

Il a été démontré que le statut énergétique de l'eau contrôlait l'expression génétique (Balke et Gralla 1987; Dorman *et al.* 1990). En effet, ce sont des liaisons hydrogènes *via* des molécules qui sont impliquées dans la conformation super-enroulée de la double hélice. Une baisse de l'activité de l'eau va engendrer une transition structurale de la molécule d'ADN, ce qui va avoir des effets au niveau de la réplication et de la transcription.

Au niveau génétique, le « water stress » n'agit pas uniquement au niveau structural de la molécule d'ADN, mais également en affectant les protéines responsables de la régulation génétique (Hallsworth 1998).

De plus, l'éthanol est un inducteur de mutants déficients de la respiration. Ce sont les mitochondries et plus particulièrement l'ADN mitochondrial qui sont affectés (Ibeas et Jimenez 1997) mais le mécanisme d'action n'est pas connu.

**III.2.ii. Influx et efflux de protons à travers la membrane : Rôle de l'ATPase membranaire**

La présence d'éthanol induit une augmentation de l'influx de protons. Le gradient transmembranaire s'en trouve alors fortement affecté (Cartwright *et al.* 1987; Leao et van Uden 1984). Or une baisse de ce gradient électrochimique peut être critique pour la cellule.

Pour lutter contre la diminution du gradient de protons, l'activité de l'ATPase membranaire est stimulée chez des cellules cultivées en présence d'éthanol (Alexandre *et al.* 1994a). En effet, l'ATPase membranaire est *in vitro* sensible à la présence d'éthanol, mais après culture de *Saccharomyces cerevisiae* en présence d'éthanol l'activité spécifique de l'ATPase dans les membranes est activée et la sensibilité de l'enzyme à l'éthanol baisse (Alexandre *et al.* 1994a) afin de maintenir le pH intracellulaire (Dombek et Ingram 1987). Lors de cultures en présence d'éthanol, la conséquence physiologique est donc une activation de l'efflux de protons. L'activité spécifique de l'ATPase se trouve stimulée alors qu'il semble que la quantité de protéines ATPase diminue dans les membranes à cause de l'éthanol (Monteiro *et al.* 1994). De plus, Aguilera *et al.* (2006) corrèle à 96,6% la tolérance à l'éthanol (inhibition de 50% du taux de croissance) avec l'activité ATPasique après un choc éthanol 4% pour différentes souches de levures vinicoles.

Le mécanisme par lequel l'activité de l'ATPase se trouve activée peut être dû à la modification de la composition lipidique de la membrane. Plusieurs études ont reporté l'influence de l'environnement lipidique sur l'activité de l'ATPase. La présence d'acides gras à longue chaîne (Johannsson *et al.* 1981a; Johannsson *et al.* 1981b), d'acides gras insaturés (Aguilera *et al.* 2006), d'ergostérol (Aguilera *et al.* 2006) et le rapport stérol : phospholipides (Cooke et Burden 1990), ainsi que la composition en phospholipides (Dufour et Goffeau 1980) semblent avoir une influence sur l'activité de l'ATPase. De plus, HSP30, une chaperonne membranaire induite en cas de stress éthanol (Piper *et al.* 1994), pourrait avoir un rôle de conservation de l'énergie en limitant la consommation excessive d'ATP par l'ATPase membranaire (Piper *et al.* 1997)

### **III.2.iii. Modification de la perméabilité et de la fluidité membranaire**

La cellule répond au stress éthanol en augmentant ce que les auteurs appellent « la pression interne » de la membrane (Conrad et Singer 1981). La « pression interne » est constituée de toutes les molécules : stérols, phospholipides insaturés, protéines intrinsèques présentes dans la membrane et qui sont absentes des bicouches synthétiques. Le rôle de la « pression interne » est de tamponner les propriétés structurales et thermodynamiques des phospholipides (Conrad et Singer 1981). La « pression interne » des membranes biologiques permet de limiter la solubilité des molécules amphiphiles comme l'éthanol. En effet, la concentration de petites molécules amphiphiles comme l'éthanol dans les membranes biologiques n'excède pas  $1/10^{\text{ème}}$  de la concentration dans la phase aqueuse ; alors que dans les vésicules phospholipidiques synthétiques, le ratio  $[\text{EtOH}]_{\text{phase aqueuse}} / [\text{EtOH}]_{\text{vésicule}}$  est proche de l'unité (Conrad et Singer 1981).

Il a été démontré que l'éthanol modifiait la composition de la membrane plasmique chez les microorganismes procaryotes (*E.coli* (Dombek et Ingram 1984) ; *Zymomonas mobilis* (buchholz *et al.* 1987)) ainsi que chez les microorganismes eucaryotes tels que *S. cerevisiae* (Thomas *et al.* 1978).

#### **a. La composition en acides gras**

L'élévation de la concentration en éthanol induit une diminution en acides gras saturés et une augmentation en acides gras insaturés (principalement l'acide oléique C<sub>18:1</sub>) (Beavan *et al.*

1982;Sajbidor *et al.* 1995). Le niveau d'insaturation en présence d'éthanol (10 % v/v) peut augmenter de 25 % (Alexandre *et al.* 1994a).

De plus, une complémentation en acide oléique dans le milieu induit une augmentation de la tolérance à l'éthanol chez *S.cerevisiae* (Ghareib *et al.* 1988). Des expériences de complémentation en acides gras de longueurs de chaînes aliphatiques égales mais de degrés d'insaturation différents (acide oléique, acide linoléique, acide linoléique...) chez *S.cerevisiae* montrent que la tolérance à l'éthanol (efflux de protons, taux de fermentation et assimilation de L-alanine) augmente avec le degré d'insaturation des acides gras (Mishra et Prasad 1989;Thomas *et al.* 1978).

Plus récemment, l'étude de mutants de *S. cerevisiae* déficients pour le gène *OLE1*, codant une acide gras désaturase (transformant le C16:0 et le C18:0 en C16:1 et C18:1), et complémentés par une désaturase d'insecte, qui augmente la proportion de C18:1 par rapport au C16:1, soulignent l'effet des acides gras insaturés dans la tolérance à l'éthanol et notamment l'effet plus important de l'acide oléique (You *et al.* 2003).

Certains auteurs suggèrent aussi une influence des acides gras à longue chaîne sur la tolérance à l'éthanol (Chi et Arneborg 1999)

#### ***b. La composition en stérols***

Selon certains auteurs, la proportion de stérols dans les cellules augmente lors de cultures en présence d'éthanol (Sajbidor *et al.* 1995). Or, d'autres travaux contredisent cette constatation (Alexandre *et al.* 1994b;Koukkou *et al.* 1993;Walker-Caprioglio *et al.* 1990). L'accumulation d'ergostérol peut aussi être dépendante de la concentration d'éthanol dans le milieu (Del Castillo Agudo 1992).

Cependant, une souche est d'autant plus tolérante à l'éthanol si son ratio stérols/phospholipides est élevé (Chi et Arneborg 1999;Del Castillo Agudo 1992;Swan et Watson 1998).

De même que pour l'acide oléique, une complémentation en ergostérol dans le milieu de culture induit une augmentation de la tolérance à l'éthanol en terme de viabilité chez *S.cerevisiae* (Thomas *et al.* 1978). Des résultats identiques ont été obtenus lors d'expériences de complémentation, en cholestérol, en ergostérol, en stigmastérol, et en campestérol, en condition d'anaérobiose. L'augmentation de la tolérance à l'éthanol observée est cependant

supérieure avec les stérols possédant une ramification insaturée (ergostérol et stigmastérol) qu'avec les stérols à chaîne linéaire (cholestérol, campestérol) (Thomas *et al.* 1978).

**c. Les phospholipides**

L'influence de la composition en phospholipides est controversée, d'autant que peu d'études ont été réalisées.

Les cellules enrichies en PS semblent plus tolérantes à l'éthanol que les cellules enrichies en PC ou PE (Mishra et Prasad 1988). Un ratio anion:zwitterion de la membrane élevé entraînerait une augmentation de la tolérance à l'éthanol comme suggéré par des travaux réalisés chez *E.coli* (Clark et Beard 1979). Cependant cette hypothèse est contredite par plusieurs auteurs qui notent plutôt l'importance de PC dans la tolérance à l'éthanol (Chi et Arneborg 1999; Hayashida et Ohta 1980).

Mais la capacité des levures à maintenir un taux de biosynthèse des phospholipides suffisant est aussi un facteur influençant la tolérance à l'éthanol (Alexandre *et al.* 1994b; Koukou *et al.* 1990).

**d. Les protéines membranaires et autres molécules**

Les protéines intrinsèques de la membrane participent également à la « pression interne » de celle-ci. (Jimenez et Benitez 1987). Chez *E.coli*, il fut démontré que le ratio lipides/protéines de la membrane influençait la tolérance à l'éthanol : une diminution du ratio lipides/protéines provoque une augmentation de la tolérance de la bactérie à l'éthanol (Dombek et Ingram 1984).

L'augmentation de la « pression interne » est également observable lors de la présence de petites molécules amphiphiles comme le dinitrophénol et le décanol, ce qui laisse suggérer qu'une partie des effets de l'accumulation de l'éthanol n'est pas spécifique de la molécule d'éthanol (Hallsworth 1998) mais commune à toute molécule amphiphile de petite taille.

La cellule va également réagir au stress éthanol en modifiant l'activité des enzymes membranaires. En effet, des analyses génétiques chez plusieurs levures (*Schizosaccharomyces pombe* (Gille *et al.* 1993) et *Saccharomyces sake* (Ogawa *et al.* 2000)) ont montré que la présence d'éthanol exogène stimulait l'expression de gènes codant des catalases. Ces enzymes sont impliquées lors des stress oxydatifs causés généralement par la présence de peroxyde d'hydrogène (Ventsislava *et al.* 2002). Une autre enzyme semble être impliquée dans

l'acquisition de la tolérance à l'éthanol : c'est la superoxyde dismutase (Costa *et al.* 1993). Elle agit à l'intérieur de la cellule au niveau de la mitochondrie et protégerait ainsi la cellule en transformant les radicaux superoxydes en peroxyde d'hydrogène, pris alors en charge par les catalases. La présence d'éthanol induirait donc un stress oxydatif mais les mécanismes ne sont là encore pas connus (Costa *et al.* 1993;Costa *et al.* 1997).

Généralement une cellule soumise à un stress quelconque va répondre en contrant les effets responsables du stress. Lors du stress éthanol, l'éthanol va fluidifier la membrane (Alexandre *et al.* 1994b;Ghosh 1988) et augmenter la perméabilité de la membrane (Slater *et al.* 1993). Malgré cela, la cellule en condition de stress éthanol augmente son taux d'acides gras insaturés (Thomas *et al.* 1978). Or les acides gras insaturés augmentent également la fluidité membranaire (Beney et Gervais 2001). Il y a donc une discordance entre l'effet fluidifiant de l'éthanol et la réponse de la cellule. En effet, on pourrait s'attendre à ce que la levure qui perçoit une augmentation de la fluidité de sa membrane plasmique, cherche à contrer ce phénomène en rigidifiant la membrane (Bottema *et al.* 1985). Au lieu de cela la levure incorpore dans sa membrane des composés qui augmentent la fluidité de celle-ci. Les auteurs expliquent cette discordance physiologique par le fait que les acides gras insaturés ne seraient pas utilisés par la cellule pour contrôler la fluidité membranaire (Jones et Greenfield 1987), mais plutôt la perméabilité membranaire : ce qui s'explique par le fait que les doubles liaisons vont provoquer des coudes dans les chaînes hydrocarbonées des phospholipides. Ces coudes apolaires vont constituer des obstacles à la diffusion passive des composés polaires engendrée par la présence d'éthanol.

### **III.3. Réponse transcriptomique à la présence d'éthanol**

La réponse de la cellule de levure à la présence d'éthanol a été étudiée :

- après un ajout d'éthanol exogène (Alexandre *et al.* 2001;Fujita *et al.* 2004),
- pendant une fermentation alcoolique (Devantier *et al.* 2005a;Shima *et al.* 2005)

Lors d'un choc éthanol à 7% (v/v) sur des levures en phase exponentielle (Alexandre *et al.* 2001), Alexandre *et al.*(2001) isolent 194 gènes induits de plus de trois fois, et 201 réprimés de plus de 3 fois après le choc éthanol. La famille de gènes sur-exprimés la plus importante est la famille « cell rescue defense and virulence »(Alexandre *et al.* 2001), en réponse à un stress environnemental, notamment certains gènes connus dans la réponse au choc thermique

(Heat Shock Protein). Parmi les familles de gènes induits, il y a aussi le métabolisme énergétique, le maintien de l'homéostasie cellulaire, la synthèse et dégradation du tréhalose et la réponse au stress oxydatif (Alexandre *et al.* 2001).

(Fujita *et al.* 2004) ont étudié la réponse transcriptionnelle de la levure après incubation 2 heures dans différents alcools de toxicité croissante (éthanol, 1-pentanol, 1-octanol) et un hydrocarbure (n-pentane) moins toxique que l'éthanol. Les alcools pénètrent à l'intérieur de la cellule et endommagent les organelles cellulaires, contrairement à l'alcane. De même la réponse transcriptomique est beaucoup plus intense pour les alcools que pour le pentane. Entre 176 et 373 gènes sont sur-exprimés en présence d'un alcool contre seulement 35 en présence de pentane, avec de plus des ratios de sur-expression nettement plus faibles. Les alcanes sont moins toxiques que les alcools pour les levures soulignant encore l'importance de la fonction hydroxyle dans le processus de toxicité (Fujita *et al.* 2004;Weber et de Bont 1996). Une exposition aux différents alcools entraîne, là aussi, l'induction des gènes de réponse au stress (*HSP12, 26, 30, 78, 82, 104, SSA3, 4 et SSE2*). La présence de pentane n'induit pas ce type de réponse. L'induction de gènes liés à l'énergétique cellulaire est aussi caractéristique de la présence d'alcool. Ils émettent l'hypothèse d'une action des alcools au niveau des fonctions hydrophiles des phospholipides des membranes qui perturberaient la fluidité membranaire et le fonctionnement de l'ATPase membranaire. En présence de pentanol et d'octanol (Fujita *et al.* 2004), quelques gènes liés à la synthèse et la dégradation des acides aminés sont sur-exprimés.

Ces différentes études se sont attachées à la compréhension de la réponse transcriptomique de la levure après ajout d'éthanol exogène. Mais que se passe-t-il pendant la production d'éthanol et comment la levure peut-elle se protéger de son propre éthanol produit ?

L'interprétation des résultats transcriptomiques lors de fermentations alcooliques n'est pas aussi aisée car plusieurs phénomènes se succèdent voire se superposent. Dans les productions de boissons fermentées, les levures sont aussi soumises à des conditions particulières : milieu complexe, anaérobiose, carence nutritionnelle, forte pression, hautes densités cellulaires ou encore basse température. Les fermentations oenologiques (Marks *et al.* 2003;Perez-Ortin *et al.* 2002;Rossignol *et al.* 2003) et brassicoles (James *et al.* 2003;Olesen *et al.* 2002) ont été explorées. Mais ce n'est pas avec ce type de procédés, car trop complexes, que l'on peut mettre en évidence les gènes impliqués dans la tolérance à l'éthanol. Il existe d'autres procédés, comme le procédé VHG (Very High Gravity), qui visent uniquement à produire de l'éthanol et qui ont été étudiés d'un point de vue transcriptomique (Devantier *et al.* 2005b;Devantier *et al.* 2005a;Shima *et al.* 2005).



Shima *et al.* (2005) comparent la même souche de levure sur milieu synthétique et sur mélasse en fed-batch. La levure étant plus résistante aux stress sur mélasse, ils espèrent ainsi identifier les gènes impliqués dans cette résistance. Ils ont réussi, par l'analyse génomique fonctionnelle, à mettre en évidence l'induction de gènes liés à la synthèse et à l'assimilation de vitamines (biotine, thiamine et pyridoxine) dans le milieu-mélasse, suggérant une plus faible concentration en vitamines dans ce milieu. Inversement, il suppose une carence en fer dans leur milieu synthétique car des gènes impliqués dans l'utilisation du fer y sont sur-exprimés

De même, Devantier *et al.* (2005a) ont comparé, en procédé batch VHG, une souche de laboratoire et une souche industrielle, plus tolérante aux stress. Le milieu contient initialement 280 g.l<sup>-1</sup> de maltodextrine. La différence de comportement au niveau transcriptomique des deux souches se situe surtout pendant la phase stationnaire. La souche industrielle, plus tolérante que la souche de laboratoire sur-exprime plus de gènes liés au stress cellulaire. Les deux souches expriment différemment *ADH7* et *GDH1*, suggérant une meilleure régulation de la balance redox pour la souche industrielle et elles semblent réguler de manière différente les transporteurs d'hexose.

Les deux études précédentes peuvent permettre d'optimiser les procédés mais n'ont malheureusement pas permis de mettre directement en évidence les gènes impliqués dans la tolérance à l'éthanol.

### III.4. Gènes impliqués dans la tolérance à l'éthanol

Pour essayer de mettre en évidence les gènes impliqués dans la tolérance à l'éthanol, plusieurs stratégies ont déjà été utilisées :

- l'étude de la tolérance de différents mutants (Inoue *et al.* 2000;Kajiwara *et al.* 2000;Novotny *et al.* 1992;Takahashi *et al.* 2001;van Voorst *et al.* 2006),
- la comparaison de l'expression génique en phase de croissance de souches ou de mutants présentant des degrés de tolérance différents (Ogawa *et al.* 2000;Takahashi *et al.* 2001),

La comparaison de l'expression génétique de souches mutantes tolérantes à l'éthanol et de l'expression génétique de souches sauvages sensibles à l'éthanol a permis de révéler le rôle dans la tolérance au stress éthanol de plusieurs gènes habituellement exprimés lors des stress thermiques, osmotiques ou oxydatifs. Ces gènes sont caractérisés par des séquences consensus au niveau de leur région promotrice CCCCT, AAAAG : ces séquences sont appelées

séquence STREs par les auteurs (*STress Responsive Elements*). Parmi ces gènes, on trouve des gènes codant des enzymes de la synthèse du tréhalose (*TPS1* (van Voorst *et al.* 2006) et *TPS2*), des protéines chaperonnes (la famille des *HSP70*, *HSP12*, *HSP104*) et du glycérol (*GPD1*) et une enzyme impliquée lors des stress oxydatifs (*CTT1*) (Ogawa *et al.* 2000).

La délétion de *ERG6*, dont le produit est impliqué dans la synthèse des stérols, rend les mutants plus sensibles (Inoue *et al.* 2000) et la sur-expression de *OLE1*, qui code une  $\Delta$ -9-désaturase d'acide gras, diminue la sensibilité de la souche (Kajiwara *et al.* 2000). La présence de stérols et d'acides gras insaturés dans les membranes est déjà connue pour avoir une importance dans la tolérance à l'éthanol.

Takahashi *et al.* (2001) isolent 5 mutants de délétion sensibles à l'éthanol impliqués soit dans l'intégrité pariétale (*BEM2*, *ROM2* et *VSP34*), soit dans la conformation de l'ADN (*PAT1* et *ADA2*). L'importance de l'intégrité pariétale dans la tolérance à l'éthanol est aussi démontrée par van Voorst *et al.* (2006), après screening de la banque EUROSCARF sur 6% d'éthanol, en plus des fonctions vacuolaires et mitochondriales.

Il y a donc relativement peu de choses connues sur la réponse génétique de la tolérance à l'éthanol chez *Saccharomyces cerevisiae*. Celle-ci semble très difficile à appréhender, notamment par la nature probablement polygénique de cette réponse (D'Amore *et al.* 1990).

## III.5. Conclusion

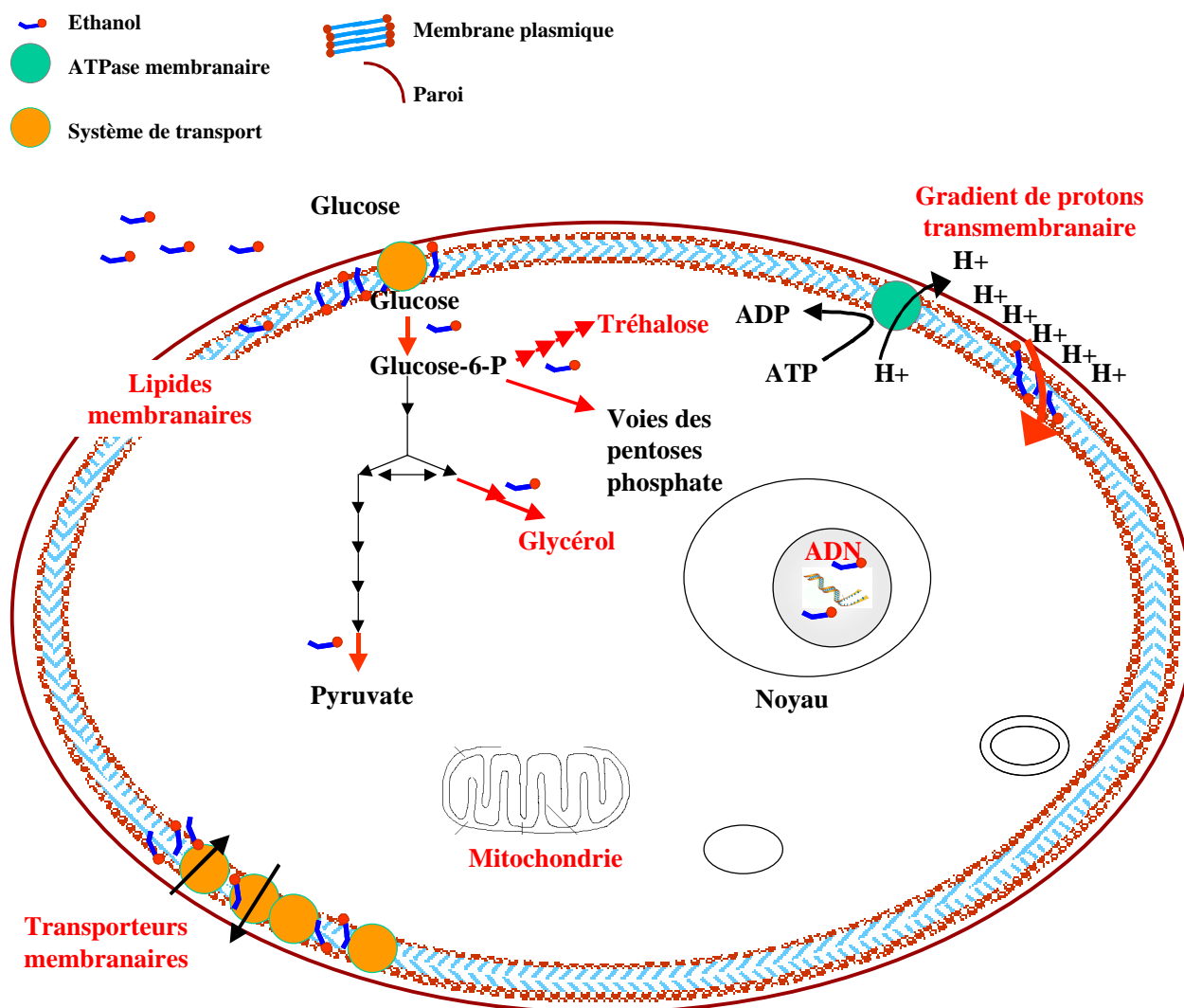


Figure 9 : Schéma récapitulatif du modèle d'action de l'éthanol sur une cellule de levure.

La première cible de l'éthanol est donc la membrane plasmique, mais l'éthanol est aussi présent à l'intérieur de la cellule (cf. figure 9). L'éthanol de part sa nature amphiphile s'immisce dans la bicouche de phospholipides. Les forces de liaisons qui maintiennent l'intégralité de la membrane s'en trouvent alors perturbées ainsi que les propriétés de la membrane. L'éthanol augmente la fluidité et la perméabilité de la membrane et le gradient de protons en est fortement affecté. De manière plus indirecte, la baisse de l'activité de l'eau a des conséquences sur les activités enzymatiques impliquées dans les voies de la glycolyse et de la synthèse d'ADN et plus particulièrement celles présentes au sein des membranes. L'activité de différents transporteurs membranaires (glucose, maltose, acides aminés, ammonium...), ainsi que de l'ATPase membranaire est aussi perturbée par la présence d'éthanol.

En réaction, la cellule modifie sa composition membranaire de manière à contrecarrer l'action de l'éthanol. Les principales modifications étudiées concernent l'influence des acides gras insaturés et des stérols sur la tolérance à l'éthanol. L'adaptation de l'environnement lipidique des enzymes membranaires en modifierait aussi les propriétés pour les rendre plus performantes dans la lutte contre l'effet inhibiteur de l'éthanol. L'éthanol agit aussi comme un stress cellulaire. Cet état général de stress cellulaire se traduit par une accumulation de tréhalose, de glycérol et l'induction de gènes impliqués dans les phénomènes de stress (HSP, HOG, stress oxydatif ...).

La tolérance à l'éthanol est un phénomène qui a été et reste encore très étudié. La littérature est très abondante dans le domaine ce qui implique parfois l'apparition de résultats contradictoires. Ceci s'explique par la complexité de la réponse mise en place et la difficulté d'étudier ce phénomène. En effet, l'éthanol exogène n'a pas la même toxicité que l'éthanol produit par la cellule elle-même (éthanol endogène) ; l'adaptation peut donc être différente. Or, il apparaît beaucoup plus simple d'un point de vue pratique d'étudier la tolérance à l'éthanol ajouté (choc-éthanol ou croissance en présence d'éthanol). Cependant, la transposition aux phénomènes observés pendant les fermentations n'est pas aisée, d'autant que la majorité des études ne va pas au-delà de 12% d'éthanol. Mais, l'étude en condition de production d'éthanol et à des fortes concentrations pose d'autres problèmes : notamment la superposition des stress (éthanol, osmotique, carence nutritionnelle), la nécessité de la maîtrise du procédé et l'obtention d'un titre élevé en éthanol. De plus, malgré la multitude des publications, de nombreuses questions sont encore sans réponse. Y a-t-il des gènes spécifiquement impliqués dans la tolérance à l'éthanol ? Quels sont-ils ? Y a-t-il une réponse unique à la toxicité de l'éthanol ? Quel(s) est(sont) le(s) signal(aux) déclencheur(s) de la réponse visant à contrecarrer l'effet de l'éthanol ?....

Le laboratoire a fait le choix d'une production par l'intermédiaire d'un réacteur bi-étagé à recyclage de la biomasse (BRM). Or, c'est un système très complexe qui nécessite une longue phase de mise au point. L'étude de l'effet de l'éthanol produit par l'intermédiaire d'un tel procédé nous est apparu trop complexe. Dans un premier temps, nous disposons d'un procédé de type fed-batch plus simple à mettre en œuvre et déjà optimisé au niveau nutritionnel. De plus, les résultats sur ce dernier ont servi de base à la modélisation du BRM. C'est donc par l'étude des différents états physiologiques de la levure au cours de fermentations fed-batch que nous espérons mieux comprendre l'effet des hautes concentrations d'éthanol produit sur la levure.

## **Partie II : Matériel et Méthodes**



## **I. Fermentation**

### **I.1. Souche**

La souche utilisée au cours de ce travail est *Saccharomyces cerevisiae* CBS 8066. Il s'agit d'une souche de laboratoire commercialisée par le Centraal Bureau voor Schimmelcultures (Hollande).

### **I.2. Milieux de culture**

#### **I.2.i. Milieu de conservation**

La souche est conservée à  $-80^{\circ}\text{C}$ , après ajout de 2 ml de glycérol à 5 ml de culture sur le milieu de composition suivante:

– Tryptone:	10 g.l <sup>-1</sup>
– Extrait de levure:	5 g.l <sup>-1</sup>
– NaCl:	10 g.l <sup>-1</sup>
– Glucose:	2 g.l <sup>-1</sup>
– Eau distillée	

#### **I.2.ii. Milieu riche**

A partir de colonies isolées sur boîte de pétri de la même composition que le milieu de conservation avec 15 g.l<sup>-1</sup> d'agar, la souche est mise en culture dans un milieu riche de composition :

– Bactopeptone:	10 g.l <sup>-1</sup>
– Extrait de levure:	10 g.l <sup>-1</sup>
– NaCl:	9 g.l <sup>-1</sup>
– Glucose:	20 g.l <sup>-1</sup>
– Eau distillée	

#### **I.2.iii. Milieux de préculture et de fermentation**

Le milieu de fermentation est un milieu synthétique basé sur celui décrit par BAUDET (1990). Il est utilisé pour les précultures et les fermentations. Les concentrations en oligo-éléments ont été adaptées selon la méthode de EGLI et FIECHTER (1981) où les

auteurs définissent, à partir de la composition cellulaire de *Saccharomyces cerevisiae*, les rendements de conversion  $R_{X/E}^1$  des oligo-éléments (Mg, Zn, Mn, Co, Cu, Mo, Ca, Fe, et B) (Egli et Fiechter 1981). Pour cette étude, les concentrations en oligo-éléments ont été calculées de façon à ne pas limiter la croissance jusqu'à 20 g.l<sup>-1</sup> de biomasse.

Composition du milieu salin de préculture :

– Sels principaux :	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> :	3,0 g.l <sup>-1</sup>
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> :	3,0 g.l <sup>-1</sup>
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 12H <sub>2</sub> O :	3,0 g.l <sup>-1</sup>
– Source azotée :	Glutamate de sodium :	1,0 g.l <sup>-1</sup>
– Oligo-éléments :	MgSO <sub>4</sub> :	0,5 g.l <sup>-1</sup>
	ZnSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O :	4,0.10 <sup>-2</sup> g.l <sup>-1</sup>
	MnSO <sub>4</sub> :	3,8.10 <sup>-3</sup> g.l <sup>-1</sup>
	CoCl <sub>2</sub> :	5,0.10 <sup>-4</sup> g.l <sup>-1</sup>
	CuSO <sub>4</sub> :	9,0.10 <sup>-4</sup> g.l <sup>-1</sup>
	Na <sub>2</sub> MoSO <sub>4</sub> :	6,0.10 <sup>-5</sup> g.l <sup>-1</sup>
	CaCl <sub>2</sub> :	2,3.10 <sup>-2</sup> g.l <sup>-1</sup>
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> Fe(SO <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> :	2,3.10 <sup>-2</sup> g.l <sup>-1</sup>
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> :	3,0.10 <sup>-3</sup> g.l <sup>-1</sup>
	– Vitamines :	Acide pantothénique :
Acide nicotinique :		5,0.10 <sup>-3</sup> g.l <sup>-1</sup>
Méso-inositol :		125,0.10 <sup>-3</sup> g.l <sup>-1</sup>
Thiamine :		5,0.10 <sup>-3</sup> g.l <sup>-1</sup>
Pyridoxine :		5,0.10 <sup>-3</sup> g.l <sup>-1</sup>
Acide para-aminobenzoïque :		1,0.10 <sup>-3</sup> g.l <sup>-1</sup>
biotine :		1,2.10 <sup>-5</sup> g.l <sup>-1</sup>
– Eau du réseau de ville <sup>2</sup>		

Chaque oligo-élément est préparé séparément sous forme d'une solution concentrée puis stérilisée sur filtre Minisart 0,2 µm (SARTORIUS®). Les solutions sont conservées à 4°C.

Les vitamines sont préparées sous forme d'une solution concentrée (400X ou 1000X) contenant l'ensemble des composés à l'exception de la biotine. La biotine est préparée séparément (concentrée 5000X ou 10000X). Les solutions sont stérilisées sur filtre Minisart 0,2 µm (SARTORIUS®) et conservées à 4°C.

Composition du milieu salin de fermentation : le milieu de fermentation est le même que le milieu de préculture sauf pour les vitamines qui sont rajoutées de manière séquencée au cours de la fermentation (Alfenore *et al.* 2002).

<sup>1</sup>  $R_{X/E}$  représente la quantité de biomasse (g) que l'on peut théoriquement obtenir avec un gramme d'élément E.

<sup>2</sup> L'eau du réseau est utilisée car la fermentation se déroule plus rapidement qu'avec l'eau distillée



### **I.3. Bioréacteur et conditions de culture**

Les cultures sont réalisées dans un bioréacteur de 20 litres de volume utile équipé d'un système de stérilisation en place (BRAUN®, Biostat E). Les différentes fonctions disponibles sont :

- Les mesures et régulations de température, pH, oxygène dissous, pression.
- La détection de mousse avec ajout régulé d'antimousse.
- Le contrôle de la procédure de stérilisation par vapeur vive.

La vitesse d'agitation est fixée à 400 tr.min<sup>-1</sup> jusqu'à ce que la PO<sub>2</sub> atteigne 20 % puis augmentée de façon à ne pas limiter la culture en oxygène. La température est régulée à 30°C et le pH à 4 à l'aide d'une solution d'ammoniaque à 14 % (v/v). La pression dans le réacteur est imposée à 0,2 bar (pression relative).

#### **I.3.i. Préparation de l'inoculum**

Deux tubes contenant chacun 5 ml de milieu riche sont ensemencés à partir de colonies isolées conservées sur gélose. Les tubes sont incubés pendant 16 heures à 30°C sous agitation (100 tr.min<sup>-1</sup>). Le contenu de chaque tube est ensuite transféré dans un erlenmeyer de 250 ml muni de chicanes contenant 50 ml de milieu de préculture à 40 g.l<sup>-1</sup> de glucose (pré-levain). Ces erlenmeyers sont incubés 10 heures à 30 °C sous agitation (100 tr.min<sup>-1</sup>). Chaque pré-levain sert à ensemencer un erlenmeyer de 3000 ml muni de chicanes et contenant 500 ml de milieu de préculture à 40 g.l<sup>-1</sup> de glucose. Ces cultures sont alors incubées 10 heures à 30°C sous agitation (100 tr.min<sup>-1</sup>). Nous obtenons ainsi 1 litre de levain qui servira à ensemencer 9 litres de milieu de fermentation, soit un taux d'ensemencement de 10 % (v/v).

#### **I.3.ii. Préparation du bioréacteur**

Le milieu salin est préparé initialement. Il contient les sels d'ammonium, de potassium et de sodium. 9 litres de milieu salin sont stérilisés *in situ* dans le réacteur. Les vitamines et les oligo-éléments sont ajoutés dans le réacteur après stérilisation.

Le glucose est apporté à partir d'une solution concentrée à 700 g.l<sup>-1</sup> par l'intermédiaire d'une pompe péristaltique (MASTERFLEX®) pilotée par ordinateur. Le mode d'apport de sucre est différent selon les fermentations. Il sera détaillé ultérieurement dans ce travail.

Le réacteur est connecté à un micro-ordinateur. Un programme informatique réalise l'acquisition en ligne des paramètres de contrôle du réacteur (pH, température, pression partielle en oxygène dissous, pression relative, ajouts d'ammoniaque et d'antimousse). De la même manière, la masse de glucose ajoutée dans le réacteur est estimée en temps réel par l'intermédiaire d'une balance sur laquelle est placée le bidon d'alimentation de glucose. L'ensemble des autres paramètres est obtenu hors ligne par dosage ( $\text{CO}_2$  produit,  $\text{O}_2$  consommé, biomasse, métabolites formés, glucose résiduel, etc.).

## **II. méthodes analytiques**

### **II.1. Caractérisation de la biomasse**

#### **II.1.i. Mesure de la densité optique**

La croissance cellulaire est suivie par mesure de la densité cellulaire par spectrophotométrie à 620 nm (spectrophotomètre HITACHI® U<sup>-1</sup>100) dans une cuve en verre de 2 mm de trajet optique. La suspension cellulaire est diluée de façon à obtenir une densité optique comprise entre 0,05 et 0,8 unité d'absorbance, de manière à toujours se situer dans la zone de linéarité de la méthode.

#### **II.1.ii. Détermination de la masse sèche totale**

La biomasse sèche, exprimée en  $\text{g.l}^{-1}$  est mesurée par une méthode gravimétrique.

Un volume connu de culture est filtré à l'aide d'une pompe à vide sur une membrane Sartolon polyamide 0,45  $\mu\text{m}$  (SARTORIUS®) préalablement séchée et pesée. Après filtration, les membranes sont séchées à l'étuve à 60°C sous vide (200 mm de Hg) pendant 48 heures, puis pesées. La différence de masse avant et après filtration de la suspension cellulaire sur la membrane ramenée au volume filtré permet de déterminer la concentration en masse sèche de biomasse ( $\text{g.l}^{-1}$ ).

### II.1.iii. Détermination de la viabilité cellulaire

#### a. Bleu de méthylène

Le bleu de méthylène est une molécule organique, qui peut exister sous les deux formes (cf. figure 10) :

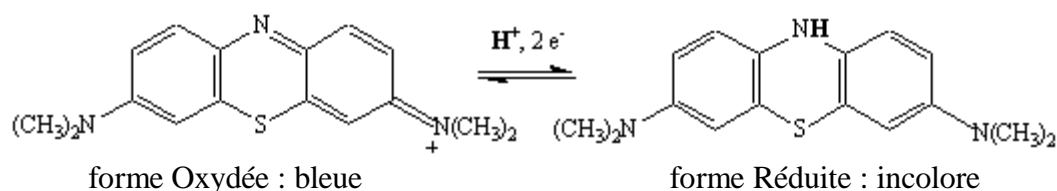


Figure 10 : Molécule de bleu de méthylène sous forme oxydée et sous forme réduite. Cette molécule va réagir avec les activités oxydoréductases des cellules encore actives.

La viabilité cellulaire est déterminée par comptage sur cellule de THOMA après coloration au bleu de méthylène. La solution colorante est préparée comme suit :

- Diluer 10 mg de bleu de méthylène dans 10 ml d'eau distillée.
- Ajouter 2 g de tricitrate de sodium dihydraté.
- Après filtration sur membrane Minisart 0,2  $\mu\text{m}$  (SARTORIUS®), compléter à 100 ml avec de l'eau distillée.

La technique consiste à mélanger 200  $\mu\text{l}$  de solution de bleu de méthylène avec 200  $\mu\text{l}$  de suspension cellulaire diluée. Après homogénéisation et 10 min d'incubation à température ambiante, les cellules sont alors comptées au microscope sur la cellule de THOMA. Les cellules viables apparaissent incolores tandis que les cellules non viables se colorent en bleu. Le pourcentage de viabilité est calculé en faisant le rapport entre le nombre de cellules viables et le nombre total de cellules.

#### a. *Fun<sup>®</sup> 1 (Molecular Probes)*

Les membranes cellulaires sont perméables au FUN<sup>®</sup> 1 (cf. figure 11). Il s'agit d'un fluorochrome qui, dans des cellules actives est internalisé sous forme des structures cylindriques intravacuolaires (appelées CIVS) rouge-orange ou jaune-orange. Les cellules inactives diffusent uniformément d'un vert-jaune intense et une absence de CIVS (Millard *et al.* 1997).

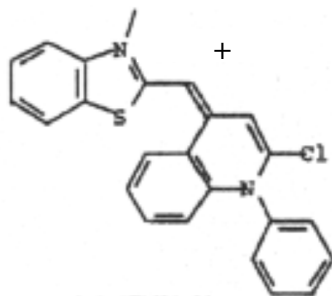


Figure 11 : Molécule de FUN<sup>®</sup> 1.

L'équivalent de 1 ml de suspension de levure à  $DO_{620} = 1$  est centrifugé 2 min à 15000 rpm. Le culot est lavé avec 1 ml de tampon HEPES (10 mM Hépès, pH = 7,2, 2% glucose), puis recentrifugé et resuspendu dans 1 ml de tampon HEPES (10 mM Hepes, pH = 7,2, 2% glucose). 0,5 ml de cette suspension est alors utilisé pour le marquage au colorant FUN<sup>®</sup> 1.

Le marquage se passe dans une salle noire car les fluorochromes ne doivent pas être exposés à la lumière. 1  $\mu$ l de FUN<sup>®</sup> 1 est rajouté et mélangé à la suspension de levure, puis le tout est laissé 30 min à 33°C.

L'observation se fait au microscope (Olympus BH2, objectif 40X, DplanApo40UVPL) équipé d'une camera CCD (DXM 1200, Nikon), sous UV (avec un filtre d'excitation  $\lambda=470$  nm). Les images sont ensuite analysées grâce au logiciel Lucia 4.6 (Laboratory imaging Ltd).

#### II.1.iv. Caractérisation morphologique de la biomasse

L'étude sur la morphologie des cellules a été réalisée à partir de photos prises au microscope à fond noir (cf. figure 12). La mesure des paramètres morphologiques se fait grâce à un programme d'analyse d'image dédié (Ohtani *et al.* 2004). Le programme permet, de manière automatique, d'identifier le contour des cellules et de distinguer les cellules seules des cellules bourgeonnantes et aussi d'isoler le bourgeon. Certaines formes cellulaires (agrégats de cellules) ne peuvent être identifiées : elles sont appelées formes complexes (cf. figure 12).

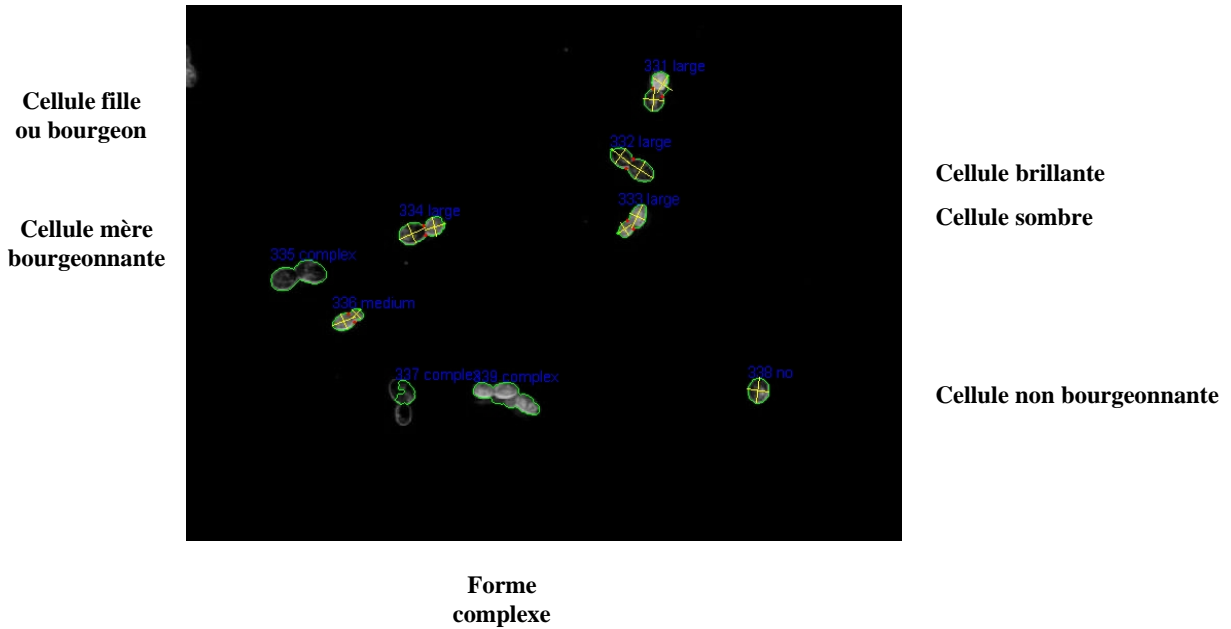
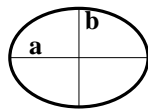


Figure 12 : Exemple d'image de microscopie à fond noir obtenue lors d'une culture typique de levure en bioréacteur ( $120\text{g.l}^{-1}$  d'éthanol produit), sur laquelle se superpose l'analyse par le logiciel d'analyse d'image développé par Ohtani *et al.* (2004) et l'identification des différentes formes.

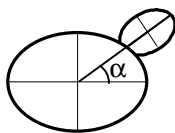
Pour chaque cellule identifiée, le programme adapte une ellipse passant au plus près des contours cellulaires. Il renvoie alors de nombreux paramètres parmi lesquels des données concernant :

- le type de cellule : non-bourgeonnante, bourgeonnante, bourgeon...
- les paramètres de forme des cellules



- $a$  = axe long
- $b$  = axe court
- Taille de la cellule = aire de l'ellipse (unité : pixel x pixel ; 1 pixel =  $0,129512\text{ }\mu\text{m}$ )
- § petit :  $100 < \text{taille cellule} < 350$
- § moyen :  $350 < \text{taille cellule} < 475$
- § gros :  $475 < \text{taille cellule} < 850$

- les paramètres concernant les bourgeons
  - Taille = la taille du bourgeon est donnée en rapport avec celui de la cellule mère :



§ petit bourgeon:  $0 < \frac{\text{taille bourgeon}}{\text{taille cellule mère}} < 0,5$

§ bourgeon moyen :  $0,5 \leq \frac{\text{taille bourgeon}}{\text{taille cellule mère}} < 0,7$

§ gros bourgeon :  $0,7 \leq \frac{\text{taille bourgeon}}{\text{taille cellule mère}}$

- orientation ou direction de croissance du bourgeon (angle  $\alpha$ )

## II.2. Dosage du glucose extracellulaire

### II.2.i. Dosage par méthode enzymatique

Le glucose est dosé au cours de la fermentation sur un analyseur automatique YSI 27 A (YELLOW SPRINGS INSTRUMENTS®). Son principe repose sur la détection de l'eau oxygénée libérée lors de la transformation du glucose en acide gluconique par une glucose oxydase fixée sur une membrane. La concentration en glucose est directement donnée en  $\text{mg.dl}^{-1}$ . La précision de l'appareil est de l'ordre de 10 %, mais la mesure est rapide. Les concentrations en glucose sont ensuite mesurées de manière précise par HPLC.

La suspension de levures est centrifugée (12000 g, 3 min). Le surnageant est séparé du culot cellulaire et dilué afin de se trouver dans la gamme de linéarité de l'appareil (0 – 2,5  $\text{g.l}^{-1}$ ).

### II.2.ii. Dosage par HPLC : cf. III.3

## II.3. Dosage glucose, éthanol, acétate, glycérol....

La méthode par HPLC décrite ici permet de quantifier, en plus du glucose et de l'éthanol, certains composés susceptibles d'être produits au cours d'une culture (glycérol, acétate, malate, succinate et lactate).

La suspension cellulaire est centrifugée (12000 g, 3 min). Le surnageant est séparé du culot cellulaire et filtré avant d'être analysé dilué ou non dilué.

**Appareil :**

- Chromatographe (WATERS®, Alliance 2690) équipé d'un réfractomètre (WATERS®) et d'un logiciel d'acquisition et de traitement des données.
- Colonne Aminex HPX-87H (300 mm x 7,8 mm).

**Conditions opératoires :**

- Température du four : 50°C.
- Volume d'échantillon injecté : 20 µl.
- Solvant et condition de séparation : H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5 mM
- Débit phase mobile (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5 mM) : 0,5 ml.min<sup>-1</sup>

**III. Analyses des composants macromoléculaires**

**III.1. Protéines : méthode du Biuret (Gornall *et al.* 1949; Lange et Heijnen 2001)**

Les ions Cu<sup>2+</sup> (ajoutés sous forme de sulfate de cuivre) se lient aux atomes d'azote des liens peptidiques de la protéine dans des conditions de pH alcalin, produisant ainsi un complexe de couleur mauve avec absorption maximale à 540-550 nm.

**Matériel spécifique :**

Bain-marie à 100°C

- Tubes en verre

**Solutions :**

- solution de NaOH à 3N (w/v)
- solution de sulfate de cuivre à 2,5% (w/v)
- solutions standards de BSA (Bovin Serum Albumin) de 0 à 5 g.l<sup>-1</sup>

**Protocole :**

- 2 ml de solution standard ou d'échantillon contenant les cellules entières
- Ajouter 1 ml de solution de NaOH 3N
- homogénéiser
- 5 min au bain-marie à 100°C
- Ajouter 1 ml de CuSO<sub>4</sub> 2,5 % : il se forme un précipité
- centrifuger 5 min à 14 000 rpm
- Lecture de la DO du surnageant à  $\lambda=550\text{nm}$ .

### III.2. Carbohydrates (Dubois *et al.* 1956; Herbert *et al.* 1971)

Le principe est basé sur la formation d'une coloration jaune en présence d'acide sulfurique concentré et de phénol, qui est mesurée au spectrophotomètre à 490 nm.

**Matériel spécifique :** tubes en verre à bord épais.

**Solutions :**

- solution de phénol à 5% (w/v)
- acide sulfurique concentré : solution commerciale à 95%
- solutions standards de glucose de 0 à 200  $\mu\text{g.l}^{-1}$

**Protocole :**

- 1 ml de solution standard ou d'échantillon contenant les cellules entières
- Ajouter 1 ml de solution de phénol 5%
- homogénéiser
- Ajouter 5 ml d' $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentré : attention, il faut les rajouter doucement car il y a un fort dégagement de chaleur
- Attendre 30 min à température ambiante, ensuite la couleur est stable pendant plusieurs heures.
- Lecture de la DO à  $\lambda=490\text{nm}$ .

### III.3. ADN+ARN (Herbert *et al.* 1971)

L'extraction se fait à l'aide d'acide perchlorique à 70 °C. Ensuite, les quantités d'acides nucléiques sont mesurées au spectrophotomètre à 260 nm.

**Matériel spécifique :** Tubes en verre centrifugeables.

**Solutions :**

- solution d'acide perchlorique à 0,25 N
- solution d'acide perchlorique à 0,5 N



**Protocole :**

- 25 mg masse sèche de cellules entières
- Ajouter 5 ml de solution de  $\text{HClO}_4$  0,25 N
- homogénéiser et laisser à 0°C pendant 20 min
- Centrifuger 3 min à 5000 rpm, 4°C. Jeter le surnageant
- Sur le culot de cellules, ajouter 3 ml de solution de  $\text{HClO}_4$  0,5 N
- homogénéiser et laisser à 70°C pendant 15 min
- Centrifuger 3 min à 5000 rpm, 4°C.
- Faire deux extractions supplémentaires à 70°C, pendant 15 min sur le culot récupéré après centrifugation
- Cumuler les trois extraits de 3 ml
- Lecture de la DO à  $\lambda=260\text{nm}$ .

La composition des levures en acides nucléiques est en moyenne de 10 % de la masse sèche. Sur ces 10 %, le contenu en ADN est très faible (environ 0,3 %) (Oura 1983). La très grande majorité des acides nucléiques étant des ARN, la concentration en acides nucléiques sera estimée grâce à la relation  $1\text{UDO} = 40 \mu\text{g/ml}$

**IV. Analyses des composants lipidiques**

La méthode d'extraction des lipides a été optimisée (cf. partie III). A partir de l'extrait lipidique obtenu, plusieurs quantifications peuvent être effectuées :

- mesure gravimétrique des lipides totaux
- mesure des différents lipides neutres et phospholipides par chromatographie couche mince
- mesure colorimétrique des phospholipides totaux
- mesure colorimétrique des stérols totaux

**IV.1. Extraction des lipides cellulaires (adaptée de la méthode de Stephan et al., 2004)**

La méthode d'extraction des lipides s'inspire de la méthode utilisée par Stephan *et al.* (2004) pour l'extraction des lipides mycobactériens. Elle a été adaptée pour les levures.

**Matériel spécifique :** Tout le matériel en contact avec les lipides doit être en verre.

- Flacons en verre de 100 ml
- Tubes en verre centrifugeables
- Table agitante 250 rpm
- Rotavapor
- Ballons de 250 ml en verre
- Seringue en verre 250 • l

**Solutions :**

- EDTA 0,1 M
- Méthanol contenant du BHT (butylated hydroxytoluene) à 100 mg.l<sup>-1</sup> comme antioxydant
- Chloroforme contenant du BHT (butylated hydroxytoluene) à 100 mg.l<sup>-1</sup>

**Protocole :**

- Le culot cellulaire est d'abord lavé 3 fois avec une solution d'EDTA 0,1 M.
- Les lipides cellulaires sont extraits par 4 extractions successives d'une journée, sous agitation à 250 rpm. L'extrait lipidique est récupéré après décantation des cellules ; les cellules sont alors prêtes à subir la prochaine extraction.

La proportion des solvants chloroforme (CHCl<sub>3</sub>) et méthanol (MeOH) sont différentes suivant l'étape d'extraction :

Première extraction : CHCl<sub>3</sub>/ MeOH (1V:2V)

Deuxième extraction : CHCl<sub>3</sub>/MeOH (1V:1V)

Troisième extraction : CHCl<sub>3</sub>/MeOH (2V:1V)

Quatrième extraction : CHCl<sub>3</sub>/MeOH (2V:1V).

Un volume V =15 ml pour 500 mg de cellules.

- Après la quatrième extraction, le culot cellulaire est centrifugé et lavé deux fois au chloroforme.
- Toutes les phases organiques sont mélangées et le solvant est évaporé au rotavapor.
- Les lipides sont resuspendus dans 20 ml de CHCl<sub>3</sub>/MeOH (2:1 v/v). Deux lavages au KCl 0,88% (w/v) sont effectués. Pour cela, est rajouté 1 volume de KCl pour 4 volumes d'extrait et après 10 min dans la glace, les deux phases sont séparées par centrifugation à 5 min 3000 rpm.
- La phase organique est alors évaporée au rotavapor et l'extrait lipidique est resuspendu dans un volume connu de chloroforme.
- Puis l'extrait lipidique est conservé à -80 °C ou utilisée pour l'analyse.

*Remarque* : Si l'échantillon a été conservé à  $-80^{\circ}\text{C}$ , il faut évaporer sous un courant d'azote, puis re-suspendre dans du chloroforme pour connaître avec précision le volume avant l'analyse des lipides.

#### **IV.2. Dosage des lipides totaux par gravimétrie**

**Matériel** : ballons pour rotavapor de 25 à 50 ml

##### **Protocole :**

Les extractions doivent être faites sur des quantités importantes de cellules (500 mg).

La quantification par gravimétrie consiste à tarer un ballon vide (masse initiale) , puis une fois que l'extraction est faite, l'extrait lipidique après lavage est transvasé dans le ballon puis les solvants sont évaporés au rotavapor. Le ballon doit revenir à température ambiante avant d'être pesé (masse finale). L'évaporation et la pesée sont répétées jusqu'à ce que deux pesées successives diffèrent de moins de 0,5 mg. Par différence entre la masse initiale et finale, on estime le pourcentage des lipides totaux.

#### **IV.3. Dosage des lipides par Chromatographie Couche Mince : CCM**

##### **IV.3.i. Solutions étalons**

Une solution de mélange de tous les standards à  $0,25 \cdot \text{g} \cdot \text{l}^{-1}$  est préparée dans le chloroforme à partir de solutions mères à 5 ou  $10 \cdot \text{g} \cdot \text{l}^{-1}$  selon les différents standards (cf. tableau 6).

Les standards sont préparés avec précision par pesée des différents composés pour se placer autour de la concentration théorique et les calculs seront faits avec la concentration réelle.

La séparation des différentes classes lipides se fait sur gel de silice par chromatographie couche mince. Les différents lipides cellulaires se classent en deux groupes : phospholipides et lipides neutres. Ils sont séparés sur deux plaques différentes.

Tableau 6 : Lipides standards utilisés pour l'obtention de la solution standard à  $0,25 \cdot \text{g} \cdot \text{l}^{-1}$  pour la quantification par CCM, leur fournisseur et référence.

Nom du composé	Référence
L-•-Phosphatidylinositol	SIGMA P-5766 5mg
Cardiolipin	SIGMA C-1649 10mg
L-•-Phosphatidyl-DL-glycerol, •-oleoyl-•-palmitoyl (C18:1, [cis]-9/C16:0)	SIGMA P-6956 5 mg
L-•-Phosphatidyl-Choline, dioleoyl (C18:1, [cis]-9)	SIGMA P-6354 25 mg
L-•-Phosphatidyl-ethanolamine, dioleoyl (C18:1, [cis]-9)	SIGMA P-1223 25 mg
L-•-Phosphatidyl-L-sérine	SIGMA P-6641 5 mg
L-•-Phosphatidic acid, dioleoyl (C18:1, [cis]-9)	SIGMA P-2767 5 mg
Lanostérol	SIGMA L-1504 25 g
Ergostérol	SIGMA E 65109
Squalène	SIGMA S 3626
Cholesteryl oleate	SIGMA C 9253
Ethyl-oleate	SIGMA O 9500
Acide Oléique	MERCK 1.00471
Dioleïn	SIGMA D-8894 50 mg
Trioleïn	SIGMA T-7140 100mg

#### IV.3.ii. Séparation des lipides neutres par CCM

##### Matériel :

- cuves en verre pour chromatographie couche mince
- plaque de silice 20x20 cm Alugram® Nano-SIL G/UV<sub>254</sub> pour CCM (Macherey-Nagel, Germany) : 0,2 mm de nano gel de silice.
- Seringue en verre 10 • l pour les dépôts

##### Solutions :

- Solution de standards à  $0,25 \cdot \text{g} \cdot \text{l}^{-1}$
- Hexane
- Méthyl Tertio Butyl Ether
- Acide acétique glacial

##### Protocole :

Comme leur nom l'indique, les lipides neutres ne sont pas des composés chargés. Ils comprennent : les acides gras libres ou estérifiés, les mono-, di- et triglycérides, les stérols libres et estérifiés. Ils sont séparés en utilisant des solvants peu polaires : Hexane, Méthyl Tertio Butyl Ether (MTBE),...

La séparation des lipides neutres se fait d'abord par une migration dans un solvant hexane/MTBE/acide acétique glacial (70 :30 :0,2, v/v) jusqu'à la moitié de la plaque. La plaque est séchée puis est réalisée une deuxième migration jusqu'à 1 cm du bord de la plaque avec de l'hexane seul (cf. figure 13).

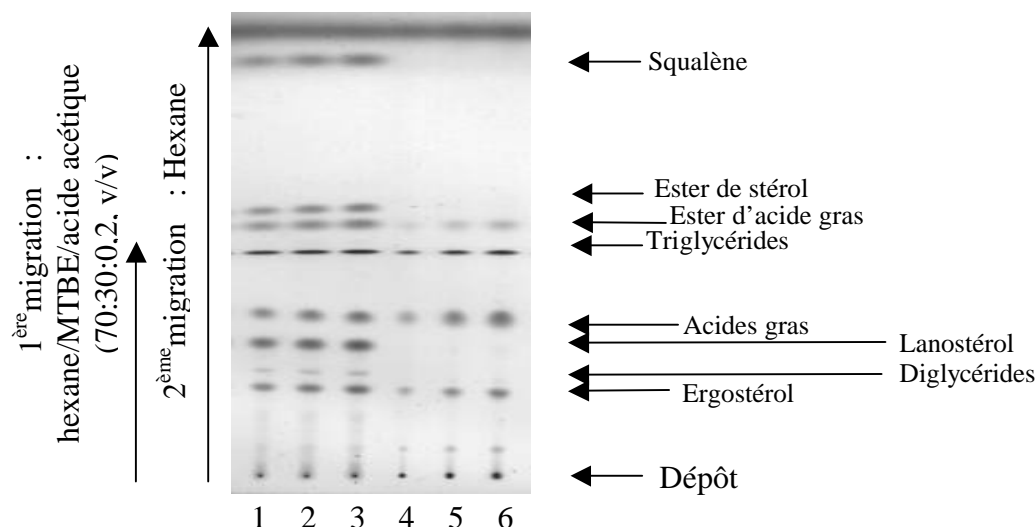


Figure 13 : Exemple de plaque obtenue après une première migration avec un mélange hexane/MTBE/acide acétique (70 :30 :0,2, v/v) jusqu'à la moitié de la plaque, puis une deuxième migration avec de l'hexane seul jusqu'à 1 cm du bord de la plaque. Ceci permet de séparer les différents lipides neutres. Les trois premiers dépôts sont des étalons. Les suivants sont des extraits lipidiques de *Saccharomyces cerevisiae* CBS8066.

#### IV.3.iii. Séparation des phospholipides par CCM

Les phospholipides sont des molécules polaires séparées en utilisant des combinaisons de solvant très polaires : eau, méthanol, chloroforme...

La migration se fait en une seule fois avec un mélange : Chloroforme/Acétone/Méthanol/Acide acétique/H<sub>2</sub>O (50/15/10/10/4 (v/v) (cf. figure 14). De telles proportions sont à la limite du mélange diphasique. Il faut rester en monophasique.

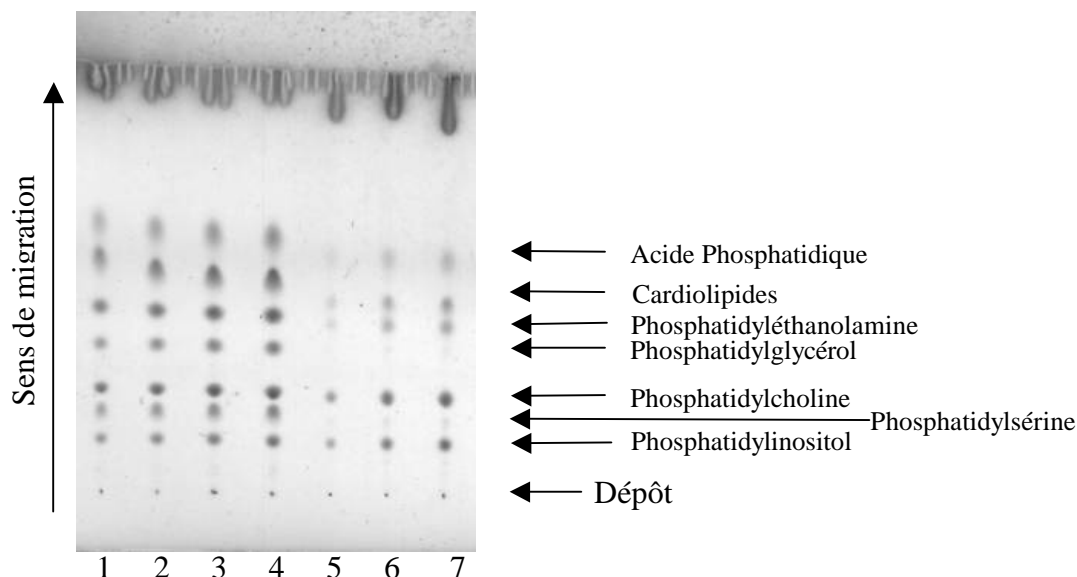


Figure 14 : Exemple de migration dans un solvant chloroforme/acétone/méthanol/acide acétique/eau (50 :15 :10 :10 :5, v/v) permettant de séparer les différents phospholipides. Les quatre premiers dépôts sont des étalons. Les suivants sont des extraits lipidiques de *Saccharomyces cerevisiae* CBS8066.

Remarque : La séparation entre l'acide phosphatidique et les cardiolipides n'est pas toujours aussi nette que sur la figure 14.

#### IV.3.iv. Révélation des lipides sur plaque de CCM

La révélation se fait par pulvérisation d'une solution  $\text{CuSO}_4$  10% (10g de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  dans 100ml de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  8% (v/v)). Une fois la plaque sèche, elle est placée environ 15 min dans un four à min  $150^\circ\text{C}$ . Pour cette révélation, la saturation des acides gras influe sur la coloration. Elle donne une réponse plus faible avec des acides gras saturés qu'avec des acides gras possédant une ou plusieurs insaturations (cf. figure 15). Mais, par rapport aux autres révélateurs utilisés (acide sulfurique, acétate de cuivre, rhodamine, dichlorofluorescéine, bichromate de potassium dans  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ), il est celui qui présente le meilleur rapport signal/bruit de fond.

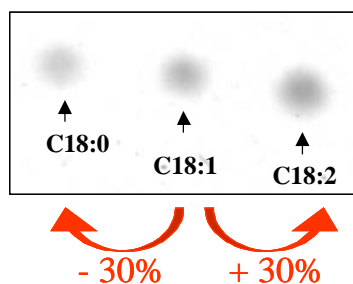


Figure 15 : Comparaison du signal du dépôt de 1 µg d'acide stéarique (18:0), oléique (18:1), et linoléique (18:2) sur plaque de silice après révélation au sulfate de cuivre (10% w/v dans H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 8% v/v).

De plus, après analyse du profil d'acides gras dans nos conditions, il y a près de 80 % d'acides gras comportant une insaturation. Nous avons donc choisi des standards composés d'acide oléique.

Les plaques sont ensuite scannées en haute résolution et l'intensité des taches est calculée à l'aide d'un logiciel d'analyse d'image : Quantity One (Bio-Rad) ou Image Quant (Molecular Dynamics). Le bruit de fond est retiré, toujours grâce au logiciel de traitement d'image. Enfin, pour chaque lipide, une courbe étalon est réalisée à partir de huit dépôts de quantités croissantes (0,25 µg à 2 µg).

#### IV.4. Dosage phospholipides totaux par une méthode colorimétrique (Rouser *et al.* 1970)

A partir des extraits lipidiques, les phospholipides totaux peuvent être quantifiés par dosage du phosphore (P) pour avoir une estimation des phospholipides. Après digestion acide à chaud, le phosphore inorganique va réagir avec du molybdate d'ammonium en donnant une couleur bleue dont la mesure à 800 nm est proportionnelle à la quantité de phosphore.

##### Matériel nécessaire :

- Bloc électrique chauffant à 180°C
- Bain-marie d'eau bouillante à 100°C
- Tubes en verre : pour les nettoyer laisser pendant une nuit dans de l'acide nitrique 30%, puis rincer à l'eau mQ.

**Solutions :**

- Acide perchlorique concentré (65%)
- Solution de molybdate d'ammonium (2,5 g dans 100 ml H<sub>2</sub>O mQ)
- Solution d'acide ascorbique (10 g dans 100 ml H<sub>2</sub>O mQ, cette solution ne se conserve pas plus d'une semaine à 4°C)
- Solution stock de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (439 mg.l<sup>-1</sup> dans H<sub>2</sub>O mQ , i.e. 100 µg P.ml<sup>-1</sup>)

**Protocole :**

- 10 à 20 µl d'extrait lipidique sont placés dans un tube en verre. Il faut que le chloroforme se soit totalement évaporé.
- Rajouter 0,65 ml d'acide perchlorique concentré 65%
- Placer les tubes dans un bain de sable à 180°C pendant au moins 1 h. Il faut attendre que la coloration jaune-marron ait disparue.
- Une fois les tubes refroidis, ajouter 3,3 ml de H<sub>2</sub>O mQ, 0,5 ml de la solution de molybdate et 0,5 ml d'acide ascorbique les uns après les autres. Il faut vortexer entre chaque ajout.
- Placer ensuite les tubes 5 min dans un bain-marie à 100°C
- Laisser refroidir et lire l'absorbance à 800nm.

Parallèlement, les solutions d'étalonnage sont préparées. A partir de la solution stock KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, sont préparées différentes solutions pour obtenir 0 à 5 µg P par tube dans 3,3 ml d'H<sub>2</sub>O mQ. 0,65 ml d'acide perchlorique est rajouté et les standards suivent le même protocole que les échantillons, sauf qu'ils ne sont pas chauffés 1h à 180°C. Normalement, 5 µg P donne une absorbance de 0,9.

**IV.5. Dosage des stérols totaux par une méthode colorimétrique (Zak 1957)**

Le principe est basé sur la solubilisation des stérols par addition d'une solution de chlorure de fer d'acide sulfurique et d'acide acétique glacial. Il se forme une coloration rouge-pourpre qui est mesurée au spectrophotomètre à 450 nm.



**Matériel nécessaire :** Tubes en verre : pour les nettoyer laisser pendant une nuit dans de l'acide nitrique 30%, puis rincer à l'eau mQ.

**Solutions :**

- Acide acétique glacial
- Solution de chlorure ferrique de composition suivante :
  - o 4 ml d'une solution à 2,5 %  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  dans 85 % d'acide O-phosphorique.
  - o 46 ml avec l'acide sulfurique. L'acide sulfurique est additionné juste avant l'utilisation de la solution de chlorure ferrique
- Une gamme étalon de 0,1 à 1  $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  d'ergostérol est préparée dans le chloroforme (le chloroforme est séché sous azote )

**Protocole :**

- 100  $\mu\text{l}$  d'extrait lipidique ou de solution étalon sont séchés sous azote
- Rajouter 3 ml d'acide acétique glacial et 2 ml d'une solution de chlorure ferrique dans chaque tube
- Les tubes sont agités et la coloration est mesurée au spectrophotomètre à la longueur d'onde de 450 nm, contre un témoin blanc (seulement les solutions d'acide acétique et de chlorure de fer).

La quantité de stérols est ensuite déterminée à partir de la gamme étalon, puis ramenée à la masse sèche de biomasse.

**IV.6. Dosage des acides gras par chromatographie gazeuse (Rozès 1992;Rozès *et al.* 1992)**

Les acides gras sont saponifiés en présence de méthanol en milieu alcalin à 100°C. Les esters méthyliques obtenus sont dosés par Chromatographie en Phase Gazeuse.

**Matériel :**

- tubes en verre
- Seringue en verre 250  $\mu\text{l}$
- Chromatographie en phase gazeuse : Hewlet-Packard 5890 connecté à un ordinateur HP Vectra. Le logiciel d'acquisition est le Software Chemstation (Agilent Technologies, Wilmington, DE, USA). La colonne utilisée est une FFAP-HP 30m x 0,25mm x 0,25•m (Agilent). L'injection de l'échantillon se fait par l'intermédiaire d'un injecteur automatique HP 7673 (Agilent).

### Solutions :

- Solution de NaOH 5% (w/v) dans méthanol/H<sub>2</sub>O (v/v)
- Solution de HCl 5N
- Solution de Hexane/MTBE (v/v)
- Solution de standard et d'étalons internes : les différents standards sont donnés dans le tableau 7. Les étalons internes sont donnés dans le tableau 8.

Tableau 7 : Noms communs, références, nombre de carbones et d'insaturations (C nombre de carbones : nombre d'insaturations) des standards d'acides gras utilisés pour la quantification par chromatographie gazeuse

Nom de l'acide gras	Référence	Nombre de C : Nombre d'insaturations
Acide caproïque	SIGMA C2250	C6
Acide octanoïque	SIGMA 15,375-3	C8
Acide Caprique	SIGMA C1875	C10
Acide Laurique	SIGMA L4250	C12
Acide Myristique	SIGMA M3128	C14
Acide Myristoléique	SIGMA M3525	C14 :1
Acide Palmitique	SIGMA P5585	C16
Acide Palmitoléique	SIGMA P9417	C16:1
Acide Stéarique	SIGMA S4751	C18
Acide Oléique	MERCK 1.00471	C18:1
Acide Linoléique	SIGMA L1376	C18:2
Acide Linoléique	SIGMA L2376	C18:3
Acide Arachidique	SIGMA 13631	C20

Tableau 8 : Noms communs, références, nombre de carbones et d'insaturations (C nombre de carbones : nombre d'insaturations) des étalons internes d'acides gras utilisés pour la quantification par chromatographie gazeuse

Nom de l'acide gras	Référence	Nombre de C : Nombre d'insaturations
Acide Heptanoïque	SIGMA H9378	C7
Acide Heptadécanoïque	SIGMA H3500	C17

Le C7 est utilisée pour la quantification des acides gras de moyenne chaîne (C6 à C14). Le C17 est utilisé pour quantifier les acides gras de longue chaîne (C16 à C20).

**Protocole :**

- Entre 10 et 15 mg masse sèche de cellules sont placés dans un tube en verre, préalablement nettoyé à l'acide nitrique 30 % pendant plusieurs heures, puis rincés à l'eau mQ.
- Ajouter 1 ml NaOH 5% (w/v) dans méthanol/H<sub>2</sub>O (v/v) et 10 µl d'étalon interne
- Vortexer
- Placer 30 min à 100°C
- Laisser refroidir
- Ajouter 500 µl de HCl 5N pour neutraliser le mélange
- Vortexer
- Deux extractions successives avec 300 µl de Hexane/MTBE (v/v) : 3 intervalles de 30 secondes d'agitation et 1 min de repos, avant de récupérer la phase organique (phase supérieure) à l'aide d'une seringue en verre de 250 µl. La phase organique est ensuite placée dans un vial.

**Condition de l'analyse chromatographique :**

- Le programme de température est : 140°C + 4°C.min<sup>-1</sup> jusqu'à 240°C
- Température injecteur : 250°C
- Température détecteur : 280°C
- Gaz vecteur : Hélium, débit 1,2 ml.min<sup>-1</sup>

**V. Analyse des composants pariétaux (Aguilar-Uscanga et François 2003a; Dallies *et al.* 1998)**

**V.1. Extraction des parois cellulaires**

Les cellules sont cassées avec des billes de verre. Après plusieurs lavages avec du tampon TE, les parois sont récupérées par centrifugation.

**Matériel :**

- Billes de verre (diamètre compris entre 0,2 et 0,5 mm)
- Appareil de cassage FastPrep<sup>®</sup> et tubes adaptés

**Solutions :**

- Tampon TE froid (Tampon Tris-HCl 10 mM, EDTA 1mM)
- Eau distillée

**Protocole:**

- Environ 50 mg masse sèche de cellules sont transférés dans un tube eppendorf à vis et lavé 3 fois à l'eau distillée.
- Resuspendre le culot dans 50 µl de TE froid
- Rajouter 0,45 g de billes de verre
- Broyer alors les échantillons au bead-beater par run de 20s à la vitesse maximale. Au moins 6 run sont réalisés. Le taux de broyage se vérifie au microscope.
- Transférer la suspension cellulaire alors dans un tube de 15 ml.
- Laver les billes au moins 5 fois avec du TE.
- Les lavages et la suspension initiale sont mélangés et centrifugés à 4000tr.min<sup>-1</sup> pendant 5 min.
- Reprendre le culot dans 1ml de TE et le transférer dans un tube eppendorf
- Centrifuger 2 min à 5000 tr.min<sup>-1</sup>. Le culot est alors lavé plusieurs fois avec du TE (jusqu'à ce que le surnageant soit clair).
- Les parois ainsi obtenues sont resuspendues dans 0,5 ml de tampon TE et conservées à -20°C.

**V.2. Dosage sucres totaux**

Le principe est basé sur la formation d'une coloration jaune en présence d'acide sulfurique concentré et de phénol, qui est mesurée au spectrophotomètre à 490 nm (Dubois *et al.* 1956).

**Matériel :**

- Tube à hémolyse
- Bain-marie à 30°C

**Solutions :**

- Solution de phénol 5% (w/v)
- H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentré 95%
- solutions standard de glucose/mannose (50/50) de 5 à 200 µg/ml

**Protocole:**

- 200 µl de suspension de paroi (ou 200 µl de solution standard) sont placés dans un tube à hémolyse
- Rajouter 200 µl de Phénol 5% (w/v)

- Puis, 1 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentré est lentement rajouté car la réaction est exothermique
- Après homogénéisation et refroidissement des tubes, les placer dans un bain-marie 20 min à 30°C
- Lire ensuite l'absorbance à  $\lambda=490$  nm

### **V.3. Dosage de la chitine (Molano *et al.* 1977; REISSIG *et al.* 1955)**

Après hydrolyse de la chitine en N-acétyl-glucosamine de manière enzymatique, le N-acétyl-glucosamine est dosé grâce au réactif de Reissig. Il se forme une coloration violette dont l'intensité, proportionnelle à la quantité de N-acétyl-glucosamine, se mesure au spectrophotomètre à 585 nm.

#### **Matériel :**

- Tubes à hémolyse
- Bain-marie à 80°C
- Bain-marie à 100°C
- Bain-marie à 37°C
- Table agitante à 37°C

#### **Solutions :**

- Solution de KOH 6% (w/v)
- Tampon phosphate 50 mM pH 6,5
- Solution de tétraborate de potassium 0,27 M, pH 9,0
- Réactif de Reissig obtenu par dilution du réactif de Reissig 10X : 10 g 4-diméthylaminobenzaldehyde, 12,5 ml HCl 10 N et 87,5 ml Acide acétique glacial. Le Reissig 10X est stable pendant plusieurs mois à 4°C et à l'abri de la lumière.
- Eau distillée
- Solutions de N-acétyl-glucosamine (0 à 10 mM) pour la calibration
- Zymolyase 20 T (Seikagaku corporation)
- chitinase de *Serratia marcescens* (SIGMA))

#### **Protocole :**

- 50 mg masse sèche de cellules sont centrifugés à 4000 g, 3 min
- Le culot est lavé plusieurs fois à l'eau
- 1 ml de KOH 6% (w/v) est rajouté au culot et le tout est transféré dans un tube en verre pyrex.
- Le tube est placé à 80°C pendant 90 min.

- Ajouter alors 0,5 ml acide acétique glacial
- Refroidir le tube dans la glace
- Centrifuger à 4000g pendant 3 min
- Laver le culot 2 fois avec de l'eau, puis avec du tampon phosphate.
- Resuspendre le culot dans 0,5 ml de tampon phosphate
- Rajouter 5U de zymolyase à 0,1 unité. $\mu\text{l}^{-1}$  et 250 mU de chitinase en solution à 5 unités. $\text{ml}^{-1}$
- La réaction se fait sous agitation douce à 37°C pendant une nuit.
- A 100  $\mu\text{l}$  de milieu réactionnel, sont ajoutés 150  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  et 250  $\mu\text{l}$  de tétraborate de potassium
- Placer le tube dans un bain-marie à 100°C pendant 8 min
- Laisser refroidir dans la glace.
- Rajouter 3 ml de réactif de Reissig 1X
- Après incubation à 37°C pendant 20 min, l'absorbance est lue à 585 nm

#### **V.4. Dosage des mannanes et des glucanes**

Après hydrolyse acide des mannanes et des glucanes, le mannose et glucose respectivement formés sont dosés par HPAEC (High performance Anion-exchange Chromatography).

##### **V.4.i. Hydrolyse acide**

Les parois obtenues précédemment sont hydrolysées en milieu acide à chaud.

##### **Matériel :**

- Etuve à 30°C
- bain-marie à 100°C

##### **Solutions :**

- Solution de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  72%
- Solution d'hydroxyde de baryum saturée
- Eau distillée

##### **Protocole :**

- 100  $\mu\text{l}$  de paroi sont transférés dans un tube eppendorf à vis
- Eliminer le surnageant après centrifugation 10000  $\text{tr}.\text{min}^{-1}$  pendant 30s

- Rajouter 50  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  72%
- Laisser 3h à 30°C
- La concentration en acide est ramenée à 2N par ajout de 650  $\mu\text{l}$  d'eau.
- Placer alors les tubes dans un bain-marie à 100°C. La réaction est arrêtée dans la glace au bout de 4 h.
- Diluer l'acide par ajout de 6 ml d'eau
- Neutraliser l'acide par ajout d'une solution d'hydroxyde de baryum saturée. 5,5 ml de la solution de baryum sont ajoutés goutte à goutte en homogénéisant régulièrement. Il se forme alors un précipité de sulfate de baryum. Les ions sulfate perturberaient l'analyse HPAEC. Il faut donc vérifier que l'on a bien tout neutralisé en mesurant le pH qui doit dépasser 7. Si le pH est inférieur à 7, il faut rajouter du sulfate de baryum.
- Ajuster le volume avec de l'eau pour avoir une concentration en sucres de 50  $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$  au maximum.
- Eliminer le précipité par centrifugation une première fois à 4000 g pendant 10 min, puis, une deuxième fois, après une nuit à 4°C.

#### **V.4.ii. Dosage par HPAEC (High Performance Anion-Exchange Chromatography)**

Les contenus en glucose et mannose des échantillons de parois hydrolysées ont été analysés en chromatographie haute performance échangeuse d'anion (HPAEC), couplée à une détection par ampérométrie pulsée.

##### **Matériel :**

- HPAEC (High performance Anion-exchange Chromatography) :
  - Chromatographe DX 500 avec détection ampérométrique
  - Logiciel : Dionex chromeleon
  - Colonne : CarboPac PA-10 (250 mm x 4 mm)

##### **Conditions opératoires :**

- Volume d'échantillon injecté : 20  $\mu\text{l}$
- Phase mobile : NaOH 18mM
- Débit phase mobile (NaOH 18 mM) : 1  $\text{ml}.\text{min}^{-1}$

Cette technique permet de séparer le glucose (résultat de l'hydrolyse des glucanes), le mannose (résultat de l'hydrolyse des mannanes) et glucosamine (résultat de l'hydrolyse de la chitine). Le temps d'hydrolyse n'étant pas le même pour la chitine et pour les glucanes et les mannanes, la chitine sera estimée par dosage enzymatique (Aguilar-Uscanga et François 2003b).

## **VI. Analyse du contenu en réserves intracellulaires (Parrou et François 1997)**

Les réserves intracellulaires sont hydrolysées par des enzymes spécifiques : l' $\alpha$ -amylglucosidase pour le glycogène et la tréhalase pour le tréhalose. Le glucose libéré est ensuite dosé par la méthode de la glucose oxydase.

### **VI.1. Lyse des cellules**

La lyse des cellules permet d'extraire les réserves intracellulaires.

**Matériel :** bain-marie à 95°C

#### **Solutions :**

- Solution de carbonate de calcium 0,25 M
- Solution d'acide acétique 1M
- Solution d'acétate de sodium 0,2 M pH 5,2.

#### **Protocole:**

- centrifuger à 12000 g, 5 min un volume de suspension cellulaire équivalent à 7 mg de biomasse sèche.
- Le culot cellulaire est alors suspendu dans 250  $\mu$ l de carbonate de calcium 0,25 M et incubé 3 heures à 95°C.
- Rajouter 150  $\mu$ l d'acide acétique 1M et 600  $\mu$ l d'acétate de sodium 0,2 M pH 5,2.

### **VI.2. Dégradation du tréhalose en unité glucose**

La dégradation du tréhalose en unité glucose est de type enzymatique.

**Matériel :** table agitante à 37°C



**Solutions :**

- Tréhalase (SIGMA®) à 0,1 U/ml (préparée dans de l'acétate de sodium 0,2 M pH 5,2)
- Solution d'acétate de sodium 0,2 M pH 5,2.

**Protocole:**

- Prélever 500 µl de l'extrait précédemment préparé
- Ajouter 20 µl de tréhalase et laisser incuber une nuit à 37°C
- Centrifuger à 12000 g, 3 min
- Doser le glucose libéré dans le surnageant par la méthode de la glucose oxydase.

**VI.3. Dégradation du glycogène en unité glucose**

**Matériel :** chambre d'incubation à 56°C

**Solutions :**

- d'-amyloglucosidase (BOEHRINGER MANHEIM®) à 8 UI/mL (préparée dans de l'acétate de sodium 0,2 M pH 5,2)
- Solution d'acétate de sodium 0,2 M pH 5,2.

**Protocole:**

- Prélever 500 µl d'extrait et ajouter 20 µl d'α-amyloglucosidase
- Incuber une nuit à 56°C
- Centrifuger à 12000 g pendant 3 min
- Doser le glucose libéré dans le surnageant par la méthode de la glucose oxydase

**VI.4. Dosage du glucose libéré**

Le glucose est dosé à l'aide du kit enzymatique 510 A (SIGMA®) par la méthode de la glucose oxydase.

**Matériel :**

- Etuve à 37°C
- Plaque de microtitration 96 puits

**Solutions :**

- Kit enzymatique 510 A (SIGMA®)
- Solutions étalons de 0 à 300 mg.l<sup>-1</sup> de glucose à partir de la solution de glucose fournie à 1 g.l<sup>-1</sup>

**Protocole :**

- 20 µl d'échantillon ou d'étalon sont déposés dans une plaque de microtitration
- 200 µl de réactif contenant les enzymes et la o-dianisine sont déposés dans chaque puit
- Laisser incuber 30 minutes à 37 °C
- L'absorbance est mesurée à 490 nm sur un lecteur de plaques (Labsystem®, Multiscan Ascent) par rapport à une solution témoin constituée de 20 µl d'eau distillée et de 200µl de réactif.

**VII. Métabolites intracellulaires**

Les cellules sont récoltées directement à la sortie du fermenteur dans une solution de méthanol 60% à -40°C pour bloquer instantanément le métabolisme. Les métabolites sont extraits avec de l'éthanol à 80°C (Gonzalez *et al.* 1997). Ils sont ensuite quantifiés par HPAEC.

**VII.1. Extraction : selon la méthode de Gonzalez *et al.* 1997**

**Matériel :**

- Bain-marie à 80°C
- Rotavapor

**Solution :**

- Solution de méthanol 60% (v/v), HEPES 10mM pH 7.5 à -40°C
- Eau distillée
- Solution d'éthanol diluée à 75% (v/v) avec de l'Hepes, 70 mM pH 7.5

**Protocole:**

- Au moins 10 mg de cellules sont recueillies le plus rapidement possible par quenching dans une solution de méthanol 60% à -40°C. Le volume d'échantillon ne doit pas dépasser 1/5 de la solution de quenching (habituellement, 5 ml d'échantillon pour 25 ml de solution à -40°C)

- Centrifuger rapidement à 5000 rpm pendant 5 min à  $-10^{\circ}\text{C}$
- Eliminer le surnageant
- 5 ml de solution d'éthanol sont aussitôt rajoutés
- Placer 3 min dans un bain-marie à  $80^{\circ}\text{C}$
- Les échantillons sont alors concentrés avec un rotavapor
- Resuspendre les échantillons dans 1 ou 2 ml d'eau
- Centrifuger à 5000 rpm pendant 10 min à  $4^{\circ}\text{C}$
- Le surnageant peut alors être analysé ou congelé à  $-20^{\circ}\text{C}$  (éviter plus de deux congélations/décongélations à cause de la dégradation de certains métabolites (ATP, PEP, pyruvate...)).

## **VII.2. Quantification par HPAEC Dionex**

Cette technique permet de déterminer les contenus intracellulaires en terme de :

- sucres phosphorylés : Glucose-6-P, Fructose-6-P, Fructose-1-6-P, Trehalose-6-P, Fructose-1-P,...
- nucléotides phosphates : AMP, ADP, ATP, GMP, GDP, GTP, UDP, UTP, UDP-glucose, UDP-actétylglucosamine....
- acides organiques : acétique, formique, pyruvique, malique, fumarique, citrique, PEP,  $\alpha$ -cetoglutarate...

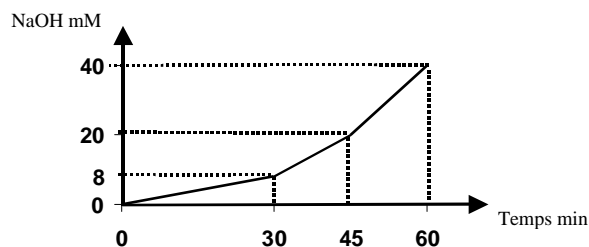
### **Matériel :**

Le système utilisé est un système DX 500 avec Chromeleon comme logiciel de commande (Dionex, Sunnidale, CA , USA). Le gradient est assuré par un système de pompes GP40. L'échantillonneur AS50 permet de garder les échantillons à  $4^{\circ}\text{C}$ . Les détections se font grâce à un détecteur électrochimique ED40 couplé à un détecteur à barrette de diode PDA100.

**Protocoles:**

*1. Nucléotides et nucléotides glycosylés*

- Colonne : IonPac AS11 avec AG11 comme pré-colonne.
- Phase mobile : NaOH

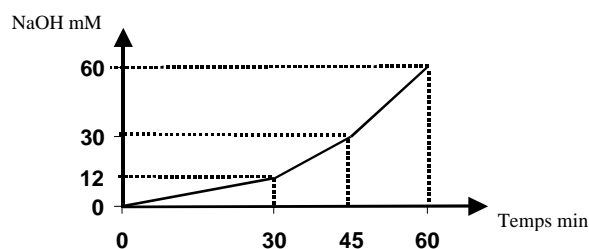


Débit : 1,5 ml.min<sup>-1</sup>

- Détection : conductimétrie couplée à une quantification à 260 nm

*2. Acides organiques*

- Colonne : IonPac AS11H avec AG11H comme pré-colonne.
- Phase mobile : NaOH + 10 % méthanol

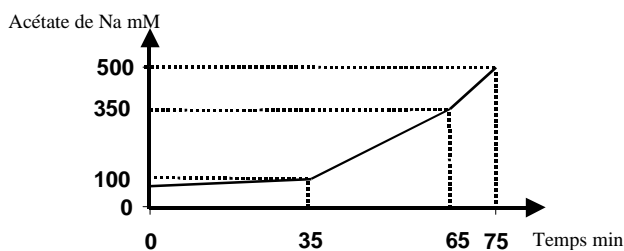


Débit : 1,5 ml.min<sup>-1</sup>

- co-élution Détection : conductimétrie couplée à une détection UV

*3. Sucres phosphorylés*

- Colonne : CarboPac PA1.
- Phase mobile : Acétate de sodium + NaOH 50 mM



Débit : 1 ml.min<sup>-1</sup>

- Détection : ampérométrie couplée à détection UV

## VIII. Analyse des profils d'expression des gènes par l'utilisation de puces à ADN de type microarray

### VIII.1. Obtention des ARNm

#### VIII.1.i. Echantillonnage des cellules

Les cellules sont récoltées dans l'azote liquide pour bloquer instantanément le métabolisme.

#### VIII.1.ii. Extraction des ARN

#### Matériel :

- MicroDismembrator (Braun, Melsungen)
- Midi kit Rneasy Qiagen

#### Solution :

- H<sub>2</sub>O-DEPC
- Solution de LiCl-DEPC 4M (LiCl 4M dans H<sub>2</sub>O-DEPC)
- Solution d'éthanol 70 % (v/v)

#### Protocole:

- L'**extraction** commence par un cassage mécanique des cellules (environ 10 mg masse sèche). Le matériel utilisé est préalablement placé dans l'azote liquide afin d'éviter toute décongélation des cellules pouvant perturber leur profil transcriptionnel. Le cassage se fait à l'aide d'une bille de tungstène de 7 mm de diamètre sur environ 10 mg de masse sèche de cellules, avec un microDismembrator dont la vitesse d'agitation est fixée à 2600 rpm pendant 2 min.
- La **purification** des ARN est réalisée grâce au Rneasy midi kit de QIAgen. Tout d'abord, les fragments de cellules sont récupérés dans un tube falcon contenant 1,9 ml de tampon RLT et 19 µl de β-mercaptoéthanol par une centrifugation à 4000 rpm pendant 5 min. Le surnageant est ensuite purifié selon le protocole fourni avec le kit. Les ARN sont d'abord fixés sur une colonne RNeasy et après plusieurs lavages avec les tampons fournis pour enlever les fragments de cellule, une étape d'élution à l'eau traitée au DEPC permet de décrocher l'ARN.
- Ces ARN sont alors transférés dans un tube eppendorf et gardés dans la glace

- Afin d'éliminer un maximum des protéines restantes, il faut précipiter pendant 1 heure à -20°C après action de 500 µl de LiCl-DEPC 4M.
- Centrifuger 15 000 rpm, 4°C, 30 min
- Le culot est lavé deux fois avec 250 µl d'éthanol à 70 %.
- Centrifuger 5 min, à vitesse maximale
- L'éthanol est enlevé à l'aide d'une pipette et le culot est séché à l'air
- Redissoudre le culot dans 50 µl de H<sub>2</sub>O-DEPC.

### **VIII.1.iii. Vérification de la qualité des ARN :**

La qualité et la quantité de l'ARN extrait sont alors vérifiées par lecture de l'absorbance à 280 nm (absorbance des protéines) et 260 nm (absorbance des nucléotides), puis par migration sur un gel d'agarose (0,8 %).

La qualité et la concentration en ARN sont aussi mesurées grâce à l'Agilent 2100 bioanalyzer. Le principe de cet appareil est de faire migrer les échantillons par électrophorèse capillaire sur gel de polyacrylamide. Les ARN sont visualisés et quantifiés par fluorescence. Il faut diluer les échantillons au 1/50<sup>ème</sup> pour se situer dans la fourchette d'analyse de 5 à 500 ng.µl<sup>-1</sup> d'ARN total.

Pour des ARN de bonne qualité :

- en terme de contamination protéique :  $1,8 \leq \frac{DO_{260nm}}{DO_{280nm}} \leq 2,1$
- en terme de dégradation des ARNm : à partir de l'aspect des ARNs ribosomiques  
(Agilent 2100 Bioanalyzer) :  $\frac{ARN_{28S}}{ARN_{18S}} \geq 1,7$

### **VIII.2. Préparation des sondes et des lames**

Après extraction de l'ADN génomique de la levure, les ORFs (Open Reading Frame) sont amplifiées par PCR avec des amorces spécifiques. Ces amorces présentent des « tag » à leur extrémité. Ces « tag » sont des séquences identiques pour les amorces de tous les gènes.

Pour chaque amplification, l'enzyme utilisée varie selon la taille des fragments à amplifier mais le programme reste le même (cf. tableau 9).

Tableau 9 : Procédure d'amplification des ORFs de levure.

	Fragments < 3kb	Fragments >3kb
ADN génomique	1 µl	1 µl
Tampon	10 µl de tampon 10X buffer (10mM TRIS-HCL, 500mM KCl, 15mM MgCl <sub>2</sub> )	10 µl tampon 1 du kit long expand (Boehringer Mannheim)
dNTP (25mM chacun)	1 µl	1 µl
Amorce 1	2 µl	2 µl
Amorce 2	2 µl	2 µl
Enzyme	0,3 µl de Taq polymérase (Sigma) 0,3 µl de pfu polymérase (Promega)	1µl d'enzyme mix du kit long expand (Boehringer Mannheim)
H <sub>2</sub> O mQ	Compléter à 100µl	

Le programme d'amplification est le suivant : 94°C pendant 2min, suivi de 10 cycles (10 sec à 94 °C, 30 sec à 55 °C, 8 min à 68 °C) et de 25 cycles (10 sec 94 °C, 30 sec 55 °C, 8 min à 68 °C + 20 sec par cycle supplémentaire 68°C) et enfin 7 min à 68°C

La présence du fragment d'ADN amplifié est contrôlée sur gel d'agarose 0,8 %.

Les lames utilisées sont des dendrilames (Le Berre *et al.* 2003). Les sondes ont été spottées à la Plateforme Transcriptome-Biopuce de Toulouse. Les dépôts ont été faits par un jeu de 4x4 aiguilles sur la lame de verre préalablement activée, puis fixés de manière covalente (Le Berre *et al.* 2003). Chaque aiguille spotte un bloc de 21 lignes sur 20 colonnes. Chaque ORF est spotté en duplicat, l'un à coté de l'autre sur la même ligne. Il y a en tout 32 blocs (8 lignes de blocs x 4 colonnes) de 420 dépôts (soit 210 ORFs différents environ car il y a des spots vides). En tout, il y a 6074 ORFs en duplicat soit 12148 dépôts sur chaque lame.

### VIII.3. Rétrotranscription en ADNc et marquage

Les ARN messagers sont retrotranscrits à l'aide d'une transcriptase reverse en présence de nucléotides dCTP marqués par un fluorochrome Cy5 ou Cy3. Les ADN complémentaires marqués ainsi obtenus sont les cibles hybridés sur lame de verre.

**Matériel :** bain-marie à 37°C, à 42°C et à 70°C.

**Solutions :**

- Réactifs fournis dans le kit CyScribe First-Strand cDNA Labelling (Amersham Biosciences)
- NaOH 2,5 M
- HCl 2M

**Protocole :**

Les ARN sont gardés dans la glace tout au long du mélange des réactifs.

Un premier mélange est réalisé, tel que le volume final soit 11  $\mu$ l.

20 $\mu$ g d'ARN totaux	X $\mu$ l
Random nonamers	1 $\mu$ l
Oligo(dT)	1 $\mu$ l
Eau (fournie dans le kit)	Y $\mu$ l
<hr/>	
Total	11 $\mu$ l

X est le volume de solution d'ARN prélevé pour avoir 20  $\mu$ g d'ARN totaux. Il est calculé à partir de la concentration en ARN totaux de l'échantillon donnée par l'Agilent 2100 bioanalyzer. Y est le volume d'eau ajoutée qui est ajusté en fonction de X.

Le mélange ainsi obtenu est homogénéisé par pipetages successifs et placé à 70°C pendant 5 min. Puis, il est laissé 10 min à température ambiante : les primers s'hybrident aux ARNm. L'échantillon est centrifugé 30 s pour collecter tout le mélange, puis est placé dans la glace.

Sont alors rajoutés les éléments suivants dans l'ordre :

5 x CyScript buffer	4 $\mu$ l
0.1 M DTT	2 $\mu$ l
dCTP nucleotide mix	1 $\mu$ l
dCTP CyDye-labelled nucleotide	1 $\mu$ l
CyScript reverse transcriptase	1 $\mu$ l
<hr/>	
Total	20 $\mu$ l

Après avoir vortexer et centrifuger 30 s, les tubes sont incubés 2 h à 42°C pour la synthèse des cDNA marqués.

Les ARN sont ensuite hydrolysés par ajout de 2  $\mu$ l de NaOH 2,5 M et laissés 15 min à 37°C. Pour neutraliser, 10  $\mu$ l de solution acide chlorhydrique 2M sont ajoutés.



Les ADNc marqués sont ensuite purifiés sur colonne CyScribe™ GFX™ (Amersham Biosciences). Les colonnes permettent de purifier des fragments de taille supérieure à 50 bases.

Tout le mélange est placé dans une colonne, où ont été déposés au préalable 500 µl de Capture buffer fournit dans le kit. Après centrifugation à vitesse maximale pendant 30 s dans une microcentrifugeuse, la colonne est lavée trois fois avec 600 µl de tampon de lavage fournit dans le kit. Les ADNc sont enfin élués avec 60 µl de tampon d'éluion fournit.

#### **VIII.4. Qualité de la rétrotranscription**

La purification sur colonne permet de se débarrasser des nucléotides non incorporés. La qualité du produit, ainsi obtenu après rétrotranscription et purification, a pu être estimée par :

- la quantité d'acides nucléiques présents
- la quantité de Cy3 et de Cy5 incorporé dans les acides nucléiques

Pour avoir une idée des quantités d'acides nucléiques présents, le flurochrome Ribogreen a été utilisé. Dans le kit Ribogreen (Molecular Probes) est fournie une solution de TE 20X qui sera diluée dans H<sub>2</sub>O DEPC, et le ribogreen 200X qui sera dilué dans du TE.

4 µl d'échantillon sont dilués dans 80 µl d'H<sub>2</sub>O DEPC et placés dans une plaque de microtitration de 96 puits. Le Ribogreen est rajouté 5 min avant la lecture.

Pour la quantification de la fluorescence des Cy3 et des Cy5, 6 µl d'échantillon sont dilués dans 14 µl H<sub>2</sub>O DEPC et placés dans une plaque de microtitration de 384 puits.

La lecture se fait grâce au Typhoon 9400 (Amersham bioscience) en ajustant les longueurs d'onde d'excitation et d'émission des différents fluorochormes (cf. tableau 10).

Tableau 10 : Longueurs d'onde d'excitation et d'émission des différents fluorochromes utilisés

	Excitation (nm)	Emission (nm)
Ribogreen	500	525
Cy3	532	570
Cy5	633	670

Ces techniques n'ont été utilisées ici que pour comparer des quantités relatives entre échantillons. Pour avoir des quantités absolues, il faudrait établir des courbes d'étalonnage.

### VIII.5. Hybridation

10 µl de cibles sont mélangés à 300 µl de RibeHybe (Ventana), avant d'être déposés sur lame. L'hybridation se fait par hybridation automatique grâce au système Discovery (Ventana), avec les paramètres suivants :

- température hybridation : 42°C
- temps d'hybridation : 10h
- Rincage : 2X SSC

### VIII.6. Lecture du signal

Les lames sont scannées avec le Scanner GenePix 4000 (AXON INSTRUMENT) et le logiciel GenePix Pro 3.0 (AXON INSTRUMENT).

### VIII.7. Analyse des données

#### VIII.7.i. Normalisation

Après traitement des images et avant toute utilisation des données, il faut passer par une étape de normalisation pour palier aux différences entre les lames et entre les marquages. La normalisation se fait par l'intermédiaire du logiciel Biplot (<http://biopuce.insa-toulouse.fr>).

#### VIII.7.ii. Identification des gènes différentiellement exprimés : test de Student

Ensuite, pour comparer deux conditions A et B, il faut identifier les gènes qui varient d'une condition à l'autre. Pour cela, on commence par calculer les moyennes  $m_A$  et  $m_B$ .  $m_A$  et  $m_B$  sont les moyennes associées aux deux lots de données à comparer pour un gène donné.

Une analyse du rapport  $\frac{m_A}{m_B}$  de sous ou sur-expression ne suffit pas pour conclure. Pour poursuivre l'analyse, il faut appliquer un test statistique pour savoir si le gène est significativement différent entre les deux conditions, c'est-à-dire si la différence entre  $m_A$  et  $m_B$  n'est pas due aux erreurs expérimentales. Le test utilisé est le test de Student.

Le test de Student permet de comparer deux lots de données. Il renvoie une probabilité qui permet de dire pour chaque gène, si le test est significatif, c'est-à-dire si les deux lots de données peuvent être considérés comme différents.

Pour calculer la probabilité de Student associée à chaque gène, il faut d'abord calculer le nombre  $T_s$  selon la formule suivant :

$$T_s = \frac{|m_A - m_B|}{\sqrt{\frac{(s_A^2 + s_B^2)}{n}}}$$

Où  $n$  = nombre de valeurs servant au calcul de  $m$  et  $s$

$m$  = moyenne sur les  $n$  spots correspondant à un même gène

$s$  = écart-type associé aux  $n$  valeurs. Il évalue l'erreur expérimentale.

A partir de  $T_s$ , il existe des tables qui renvoient à la probabilité de Student associée.

Dans nos conditions, nous travaillons avec les ratios d'intensité des fluorochromes et nous utilisons des valeurs logarithmiques.

Ensuite, un seuil pour que le test soit significatif est fixé à 5%. La probabilité de Student calculée pour un gène donné est alors comparée au seuil : si  $P > 5\%$ , le test n'est pas significatif et si  $P < 5\%$  le test est significatif. Si le test est significatif, alors il y a moins de 5% de chance de se tromper en disant que  $m_A$  et  $m_B$  sont différentes.

L'application du test de Student se fait via logiciel Bioplot (<http://biopuce.insa-toulouse.fr>).

### VIII.7.iii. Calcul du nombre de répétitions nécessaires

Pour tenir compte des variabilités expérimentales de la technique, il est nécessaire de faire des répétitions. Plus il y aura de répétitions, plus nous aurons de précision sur la mesure. Mais il s'agit de technologies onéreuses donc il faut limiter le nombre d'expériences. Nous avons donc mis en place une stratégie pour estimer un nombre de lames suffisant en fonction de la précision souhaitée sur le ratio d'expression. En utilisant le test de Student et l'erreur moyenne sur l'ensemble du processus expérimental, nous pouvons estimer le ratio seuil de sous- ou sur-expression pertinent pour un nombre de répétitions donné.

*a. Estimation l'erreur expérimentale moyenne*

L'évaluation de l'erreur expérimentale repose sur la comparaison de lames obtenues dans les mêmes conditions. Pour chaque condition, trois extractions indépendantes sont effectuées. Afin de cumuler l'ensemble des erreurs du processus, chaque extraction suit un processus indépendant de rétrotranscription et d'hybridation (cf. figure 16).

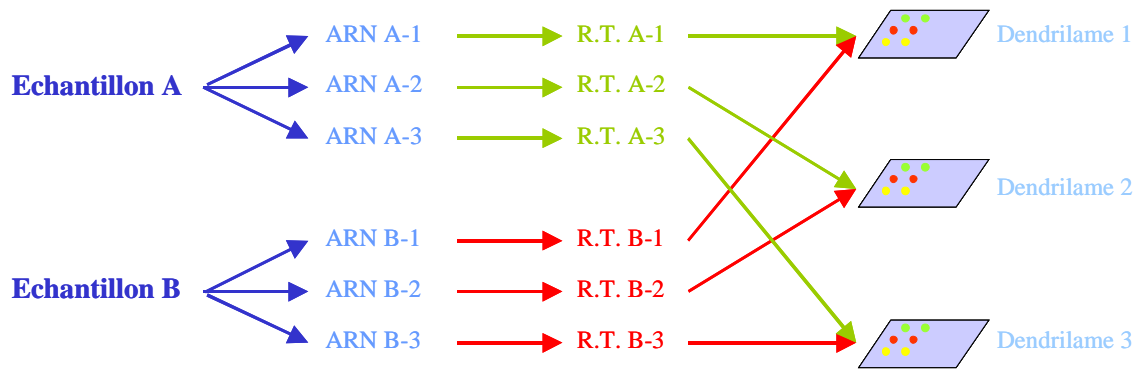


Figure 16 : Schéma récapitulatif de la démarche expérimentale aboutissant à l'estimation de l'erreur expérimentale globale du processus.

Un calcul de résidu va permettre d'estimer l'erreur expérimentale moyenne entre lames indépendantes. Un résidu représente la différence entre la valeur observée et la valeur attendue. Le calcul se fait en comparant les lames deux à deux. Il faut d'abord tracer les corrélations entre les valeurs expérimentales  $y_i = f(x_i)$  où  $y_i$  = valeur normalisée du ratio des intensités de chaque fluorochrome du spot  $i$  pour la lame 2 et  $x_i$  = valeur normalisée du ratio des intensités de chaque fluorochrome du spot  $i$  pour la lame 1.  $y_i$  et  $x_i$  sont des valeurs logarithmiques. Sans erreur expérimentale, les points  $(x_i, y_i)$  se trouveraient sur la droite d'équation  $y=x$ . Le principe de détermination du résidu est donc de calculer l'écart entre les points  $(x_i, y_i)$  et la droite  $y=x$ .

Enfin, le résidu moyen  $r_{\text{moyen}}$  s'obtient par la formule suivante :

$$r_{\text{moyen}} = \sqrt{\frac{\sum |y_i - x_i|^2}{n-1}}$$

où  $n$  = le nombre de spots sur la lame.

Le pourcentage d'erreur expérimentale s'obtient à partir du résidu moyen :

$$\% \text{ d'erreur expérimentale} = (1 - 10^{-r_{\text{moyen}}}) \times 100.$$

**Les erreurs cumulées pour les lames de verre conduisent à un pourcentage d'erreur expérimentale moyen d'environ 30%.**

Remarque : Dans cette stratégie, nous n'avons pas tenu compte des différences de marquage entre les fluorochromes. Nous aurions du faire "un dye switch" sur les données, c'est-à-dire de marquer chaque échantillon alternativement avec l'un et l'autre des fluorochromes.

***b. Estimation du ratio seuil et du nombre de lames***

Après le calcul de l'erreur expérimentale, le test de Student est appliqué avec une probabilité seuil de 5%. A cette probabilité de 5% est associé un nombre de Student  $T_s$  qui va dépendre du nombre de répétitions. En effet, soit  $N$  le nombre de lames,  $T_s$  s'exprime de la manière suivante :

$$T_s = \frac{|M_A - M_B|}{\left( \frac{r_{moyen} \times \sqrt{2}}{\sqrt{N}} \right)} \quad \text{où } M_A \text{ et } M_B \text{ sont les moyennes des intensités des spots de toutes les}$$

lames pour les conditions A et B et  $r_{moyen}$  reflète l'erreur expérimentale moyenne, il a été calculé plus haut.

Ainsi, une différence  $M_A - M_B$  est associée à un nombre de lames donné et à un seuil de probabilité donné. Comme nous travaillons, en valeurs logarithmique:  $M_A - M_B = \log(R_{A/B})$ .

Où  $R_{A/B}$  est le ratio des intensités entre les deux conditions.

Il est évident que plus il y aura de répétitions, plus on pourra abaisser le seuil de détection du ratio de sur ou sous-expression. Il faut alors trouver un bon compromis entre un minimum de lames et un rapport seuil intéressant.

Tableau 11 : Relation entre le nombre de répétitions nécessaires et le ratio seuil statistiquement détectable au-delà duquel un gène peut-être rationnellement déclaré différentiellement exprimé entre deux conditions, avec une erreur expérimentale estimée à 30%.

Nombre de lames N	9	6	5	4	3	2
Rapport seuil R	1,3	1,4	1,5	1,6	1,8	3

**Il semble donc que 3 lames par condition soit un bon compromis entre nombre de lames et niveau de sous- ou sur-expression mis en évidence. Le ratio seuil détectable est alors de 1,8.**

#### **VIII.7.iv. Analyse approfondie des résultats de l'analyse transcriptomique**

Le reste de l'analyse se fait par la combinaison de différents outils :

- des logiciels : R, Genespring (Silicon Genetics), Cluster et Treeview (Eisen *et al.* 1998), FUNSPEC (<http://funspec.med.utoronto.ca/>).
- des bases de données : SGD (Saccharomyces genome database), CYGD (Comprehensive Yeast Genome Database) de MIPS (Munich Information center for Protein Sequences), GO (Gene Ontology), YPD (Yeast Proteome Database).

# **Partie III :**

## **Choix et optimisation de la méthode d'extraction nécessaire à la quantification des contenus intracellulaires en lipides**





Les méthodes utilisées pour extraire les lipides microbiens sont inspirées de méthodes mises au point sur des échantillons biologiques tels que des denrées alimentaires (poisson,...) ou des tissus animaux (cerveau, muscle....). Les méthodes de référence en la matière sont celles de Folch *et al.* (1957) et Bligh et Dyer (1959). Ces deux méthodes reposent sur des extractions avec un mélange de solvants méthanol/chloroforme, suivies d'une étape de lavage/purification. Il existe aussi des méthodes d'extraction à chaud (type soxhlet). Ces méthodes ont dû être adaptées à des échantillons de cellules de levure.

Seront présentées ici quatre méthodes testées afin de trouver la méthode la plus adaptée dans notre cas. Les deux premières méthodes sont déjà utilisées sur des cellules de levures. La méthode 3 est inspirée d'études sur des mycobactéries et la dernière est une adaptation de la méthode au soxhlet :

- méthode 1 (Rozès 1992) : inspirée de la méthode de Folch *et al.* (1957)
- méthode 2 : méthode inspirée de la méthode de Bligh et Dyer (1959)
- méthode 3 : méthode dite de gradients de solvant inspirée de la méthode de Stephan *et al.* (2004)
- méthode 4 : méthode au soxhlet

Pour évaluer les performances de chaque méthode, il faut avoir des méthodes de quantifications fiables. Plusieurs techniques de mesure s'offrent à nous pour quantifier l'extrait lipidique :

- La gravimétrie qui mesure des lipides totaux (erreur expérimentale de l'ordre de 7%)
- Deux méthodes colorimétriques : une pour la quantification des phospholipides totaux par dosage du phosphore (erreur expérimentale de l'ordre de 7%) et l'autre pour le dosage des stérols totaux (erreur expérimentale de l'ordre de 5%)
- la Chromatographie Couche Mince : séparation et quantification des différents composés (erreur expérimentale de l'ordre de 10 %)

Dans un premier temps, les quatre principales méthodes seront comparées et une méthode sera retenue. La meilleure méthode à nos yeux a été choisie selon plusieurs critères :

- Rendement d'extraction sur standards de lipides
- Efficacité d'extraction sur cellules de levures
- Reproductibilité
- Rapidité et simplicité de mise en œuvre

Ensuite, je présenterai comment la méthode retenue a été optimisée.

## I. Choix de la méthode d'extraction des lipides cellulaires

### I.1. Descriptif des différentes méthodes

#### I.1.i. Méthode 1 (Folch *et al.* 1957; Rozès 1992) : cf. figure 17

Cette méthode consiste en une extraction méthanol /chloroforme (2:1 v/v) avec un cassage des cellules, suivie par une étape de lavage. Elle a été décrite par Rozès (1992). L'extraction a dû être adaptée au matériel disponible.

Elle est décrite pour un échantillon de 25 mg de cellules en masse sèche. Mais elle peut être adaptée pour des plus gros volumes. Les cellules sont récupérées par centrifugation à 5000 g pendant 5 min. Le culot est lavé plusieurs fois. L'échantillon peut être conservé à -80°C pour une utilisation ultérieure ou bien être utilisé immédiatement.

Sur un culot humide sont rajoutés :

- 25 µl d'EDTA 0,1 M
  - 125 µl de méthanol froid (+4°C)
  - des billes de verre de diamètre 0,50 mm jusqu'au ménisque.
  - 125 µl de méthanol froid et 500 µl de chloroforme froid
- } => permettraient d'inactiver les phospholipases

Les cellules sont broyées en utilisant un vortex treize fois 20 secondes et mises sous agitation à 250 rpm pendant 2 heures. Puis l'extrait est centrifugé à 5000 g pendant 2 min et la phase organique est récupérée.

Sur les débris cellulaires, deux extractions successives sont faites en plus dans les mêmes conditions.

Après ces trois extractions, les trois phases organiques sont réunies et purifiées au moyen d'une solution aqueuse de KCl 0,88% (w/v) (25% du volume total). Le lavage consiste à vortexer, laisser reposer 10 min dans la glace, puis récupérer la phase organique. Ce lavage est réalisé deux fois.

La phase chloroformique est ensuite séchée sur une colonne de NaSO<sub>4</sub> anhydre pour éliminer toute trace d'eau. La phase chloroformique purifiée est ramenée à sec sous un courant d'azote, puis l'extrait lipidique est repris dans 50 µl de chloroforme. L'extrait est ensuite conservé à -80 °C ou utilisé pour l'analyse.

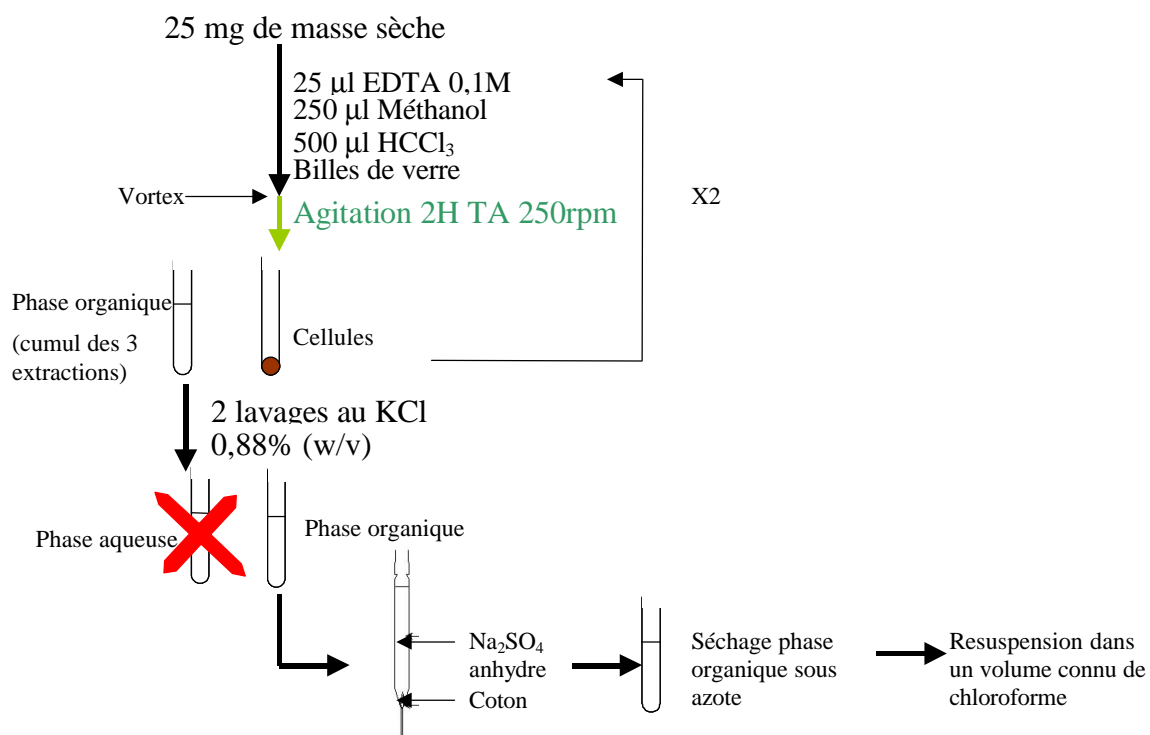


Figure 17 : Schéma descriptif de la méthode n°1 (Rozès 1992). TA = température ambiante, HCCl<sub>3</sub>= chloroforme.

### I.1.ii. Méthode 2 : extraction des lipides totaux sur biomasse fraîche : (Bligh et Dyer 1959)

L'extraction est inspirée de la méthode de Bligh et Dyer (1959) avec un solvant contenant Méthanol/Chloroforme/H<sub>2</sub>O dans les proportions 2:1:0,8 (v/v), puis les proportions sont ramenées à 2:2:1,8 (v/v) pour obtenir deux phases bien distinctes : l'une contenant le chloroforme et les lipides ; l'autre, l'eau, le méthanol et les restes de cellules.

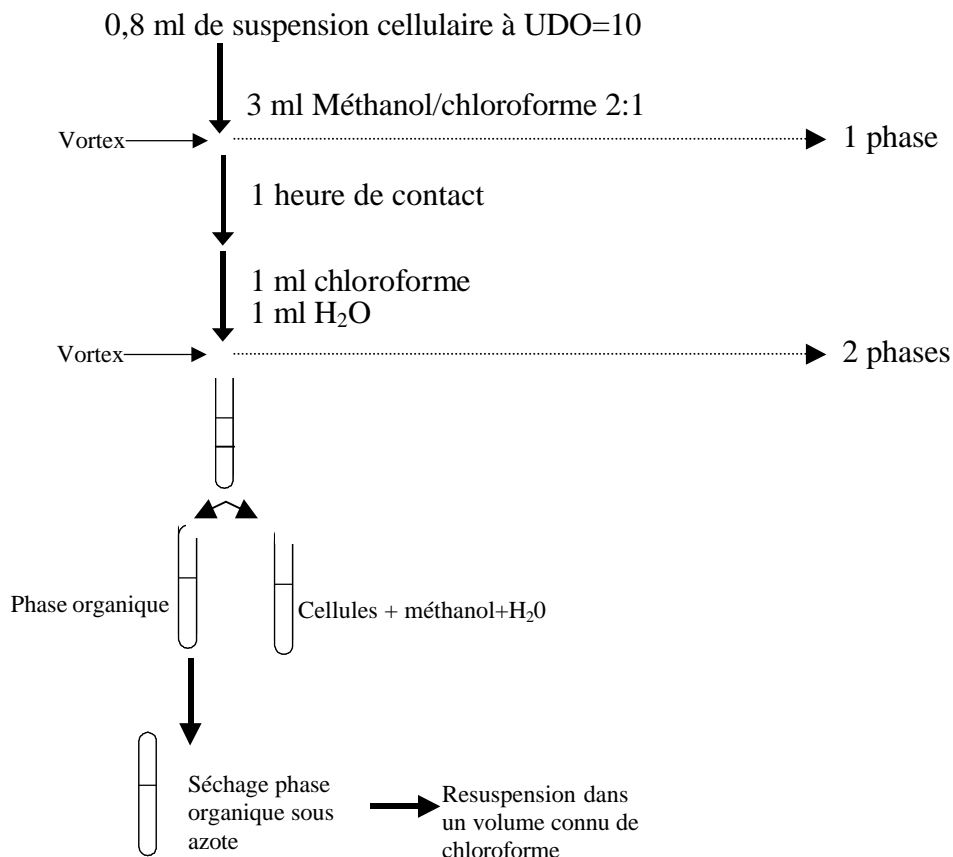


Figure 18 : Schéma descriptif de la méthode n°2

Pour les levures, l'extraction se fait directement sur une suspension de cellules :

- A 10 mg de masse sèche de cellules resuspendues dans 0,8 ml d'eau, rajouter 3ml de chloroforme/méthanol 2:1 (v/v)
- Vortexer : on obtient une phase
- Laisser en contact une heure
- Ajouter 1 ml de chloroforme, et 1 ml d'eau distillée
- Vortexer : on obtient deux phases
- Récupérer la phase chloroformique contenant les lipides
- Sécher sous vide ou sous azote.
- Reprendre dans 50 µl de chloroforme.

### I.1.iii. Méthode 3 : dite de gradient de solvant (Stephan *et al.* 2004)

Nous avons adapté une méthode utilisée initialement pour extraire des lipides mycobactériens (Stephan *et al.* 2004).

La méthode est décrite en détail dans la partie « Matériel et Méthodes » et dans la figure 19.

Quatre extractions successives sont réalisées sur le même échantillon de cellules. Le solvant d'extraction est un mélange méthanol/chloroforme de plus en plus enrichi en chloroforme (Première extraction : méthanol/chloroforme (2V:1V) ; Deuxième extraction : méthanol/chloroforme (1V:1V) ; Troisième extraction : méthanol/chloroforme (1V:2V) ; Quatrième extraction : méthanol/chloroforme (1V:2V). Les quatre extractions sont ensuite regroupées et lavées avec une solution de KCl 0,88% (cf. figure 19).

L'utilisation d'un gradient de solvant permet d'espérer extraire un plus large spectre de lipides. Cette méthode assez simple peut-être adaptée à n'importe quelle quantité de cellules au départ.

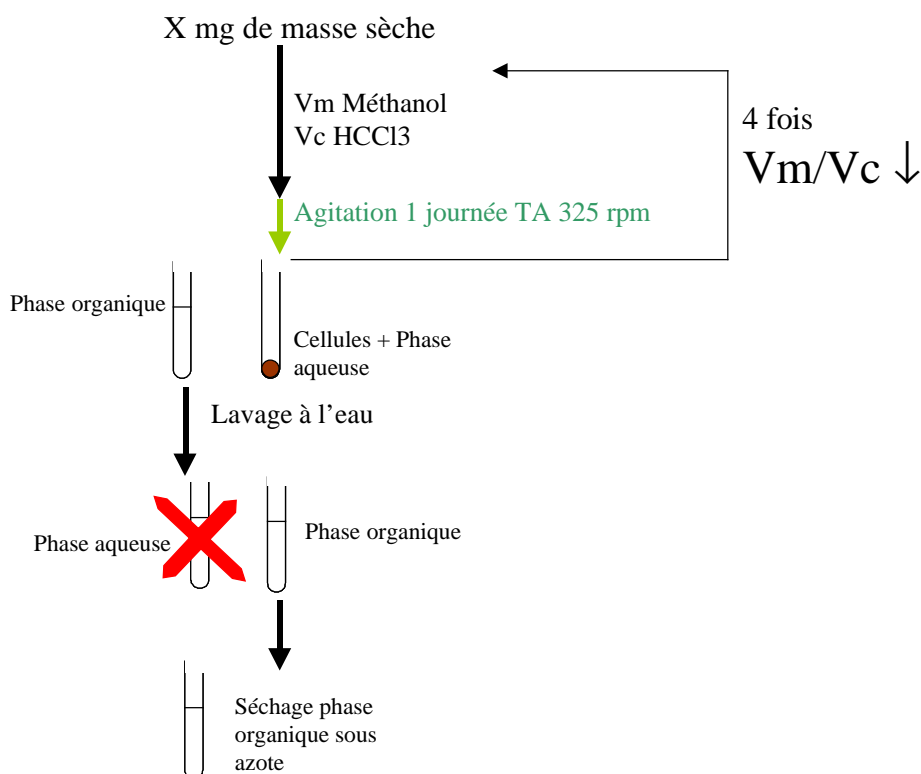


Figure 19 : Schéma descriptif de la méthode n°3.  $V_m/V_c = (2:1)$ , puis une fois  $(1:1)$  et enfin deux fois  $(1:2)$ . TA= température ambiante,  $V_m/V_c$ =volume de méthanol/volume de chloroforme.

**I.1.iv. Méthode 4 : Extraction au soxhlet**

Il faut une quantité conséquente de cellules (500 mg de masse sèche) pour utiliser cette méthode. L'extraction par solvant (100 ml de chloroforme/méthanol (2 /1)) à chaud avec un appareil de type Soxhlet est faite pendant 20 heures. Les cellules de préférence lyophilisées sont placées dans la cartouche (3) (cf. figure 20). Le ballon (2), contenant le solvant d'extraction est chauffé. La condensation des vapeurs de solvant se réalise au niveau du réfrigérant (1), le liquide retombe et s'accumule dans la partie contenant les cellules (3). Grâce à un système de siphon (4), quand le solvant (chargé de lipides) atteint le niveau du coude, tout le liquide est vidangé dans le ballon où s'accumulent les lipides au fur et à mesure des vidanges.

A la fin de l'extraction, après lavage de la phase organique, le solvant est évaporé au rotavapor, puis le résidu de lipides est pesé. L'extrait est ensuite stocké dans du chloroforme.

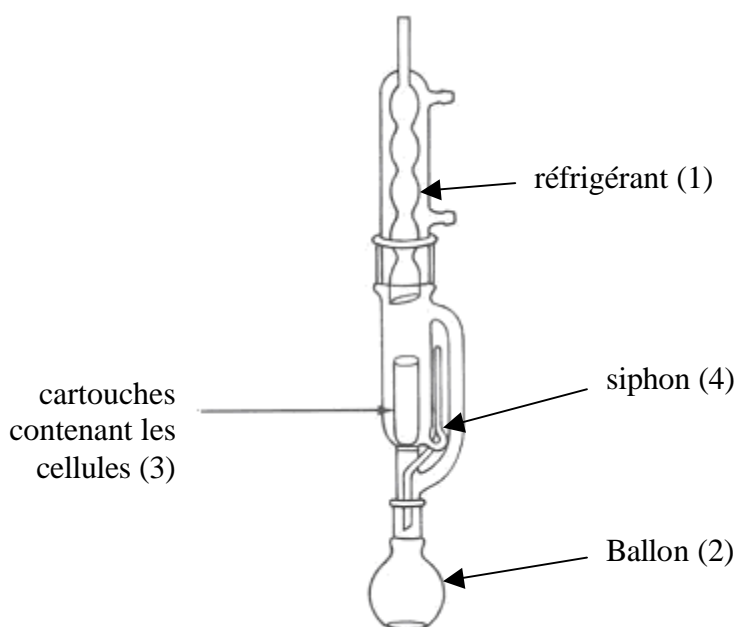


Figure 20 : Schéma descriptif de l'appareillage soxhlet de la méthode n°4.

## I.2. Critères de choix

La méthode retenue doit être quantitative. D'une part, il ne doit pas y avoir perte ou dégradation de matériel lipidique pendant l'extraction. De plus, elle doit être reproductible. Et enfin, elle doit extraire un maximum des lipides cellulaires. Cela définit donc trois critères auxquels j'ai rajouté une notion de rapidité et simplicité de mise en œuvre. Les quatre critères sont donc :

- **Le rendement d'extraction sur standards de lipides**

Le rendement d'extraction est obtenu en effectuant la totalité de l'extraction sur des solutions contenant les standards (décrits dans la partie II « Matériel et Méthodes ») en concentrations connues. Les quantités de standards recueillies après extraction sont quantifiées par CCM et ramenées au pourcentage de lipides théoriquement introduit au départ.

- **Efficacité d'extraction sur les cellules de levures**

L'efficacité est évaluée par la quantité de lipides totaux extraits sur un échantillon de cellules. La quantité de lipides contenue dans les cellules n'étant pas connue au préalable, l'efficacité absolue d'extraction ne peut être quantifiée. La meilleure efficacité relative est déterminée par comparaison des quantités de lipides extraits pour chaque méthode. Les efficacités pour les différentes méthodes sont calculées relativement à la quantité maximale extraite qui est donc assimilée à une efficacité de 100%.

- **La reproductibilité**

La reproductibilité consiste à faire au moins trois extractions par méthode sur le même échantillon de cellule. On estime alors un pourcentage de variabilité.

- **La rapidité et la simplicité de mise en œuvre**

Chacun des trois premiers critères a été évalué sur l'ensemble des quinze lipides potentiellement identifiables par CCM. Une synthèse de ces résultats est présentée dans le tableau 12.

Tableau 12 : Evaluation des différents critères dans le choix parmi les quatre méthodes d'extraction décrites ci-dessus.

Critère de choix	Méthode 1	Méthode 2	Méthode 3	Méthode 4
Rendement d'extraction (%)	- (80-100%)	+ (90-100%)	+ (90-100%)	+ (90-100%)
Efficacité (%)	+ 90%	- 70%	++ 100%	++ 100%
Reproductibilité	-		++	++
Rapidité (durée)	++ (1 journée)	+++ (quelques heures)	- (une semaine)	+ (2 jours)
Mise en œuvre	+	+	+	-

La méthode 1 présente l'inconvénient d'une succession de plusieurs étapes qui affaiblissent le rendement global et l'efficacité de l'extraction. Malgré nos tentatives d'optimisation de la méthode ce problème persiste.

La méthode 2 présente l'énorme désavantage d'être peu efficace. En allongeant le temps d'extraction à trois extractions de 2 heures, on gagne en efficacité mais celle-ci reste toujours inférieure aux méthodes 3 et 4. L'ajout d'une étape de cassage des cellules n'améliore pas l'efficacité et diminue la reproductibilité.

Les méthodes 3 et 4 présentent des performances comparables en terme de rendement, d'efficacité et de reproductibilité. Le choix entre ces deux méthodes a été fait sur le critère de mise en œuvre. La technique au soxhlet prend deux journées mais un seul échantillon peut être traité à la fois par appareil. L'extraction par la méthode 3 prend une semaine mais beaucoup d'échantillons peuvent être réalisés en parallèle. **C'est donc la méthode utilisant des gradients de solvant (n°3) qui a été retenue.**



## **II. Validation de la méthode d'extraction aux gradients de solvant : méthode 3**

### **II.1. Efficacité et optimisation des différentes étapes**

La méthode finalement retenue (cf. figure 19) est celle qui utilise des gradients de solvant. Nous avons décidé d'étudier les différentes étapes de l'extraction, afin d'optimiser cette méthode. Tout d'abord, le temps et le nombre d'étapes d'extraction ont été optimisés. Ensuite, nous nous sommes intéressés à l'étape de lavage, puis, à l'utilité de rajouter un antioxydant lors de l'extraction.

#### **II.1.i. Optimisation du nombre d'étapes d'extraction et du temps d'extraction**

Nous avons souhaité apprécier le nombre d'étapes d'extraction nécessaires. Sur un même échantillon, les différentes étapes d'extractions ont été analysées séparément. Il a été effectué six extractions successives de 1 journée chacune sur le même échantillon. Les quatre premières sont faites comme décrites dans la figure 19. La cinquième et la sixième sont faites avec un mélange méthanol/chloroforme 1V/2V. La quantité de lipides totaux extraits a été estimée dans un premier temps par gravimétrie (cf. figure 21). Comme nous pouvons l'observer sur la figure 21, des lipides sont extraits au moins jusqu'à la quatrième extraction. Il semblerait donc que pour quatre extractions, près de 97% des lipides soient extraits. Cependant, pour la cinquième et la sixième, les valeurs se trouvent dans la limite de sensibilité de la méthode par gravimétrie. Donc, nous avons utilisé une méthode plus sensible pour estimer plus précisément les quantités extraites sur les deux dernières extractions : la chromatographie couche mince (cf. figure 22).

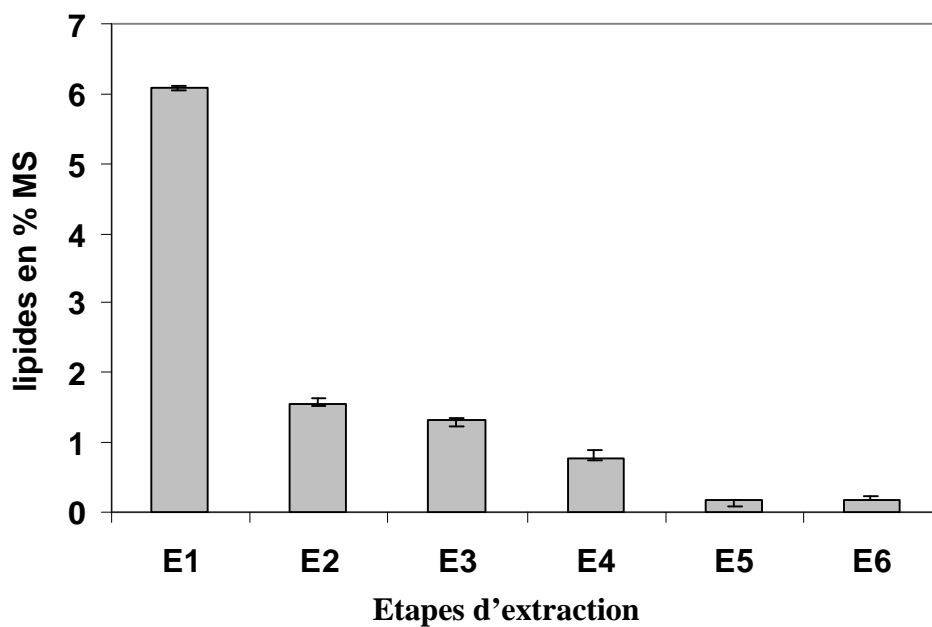


Figure 21 : Estimation par gravimétrie du contenu total en lipides, rapporté à la masse sèche (MS) de cellules, après chaque étape d'extraction (E1 à E6)

Les lipides neutres sont rapidement extraits. Trois extractions seulement semblent nécessaires. Par contre pour les phospholipides, la quatrième extraction permet encore d'extraire des quantités non négligeables, notamment de PC (cf. figure 22).

Quatre extractions semblent suffisantes car 99,7% des lipides mesurables sur CCM sont extraits au bout de ces quatre extractions, pour seulement 0,3% pour les deux dernières (cf. figure 22).

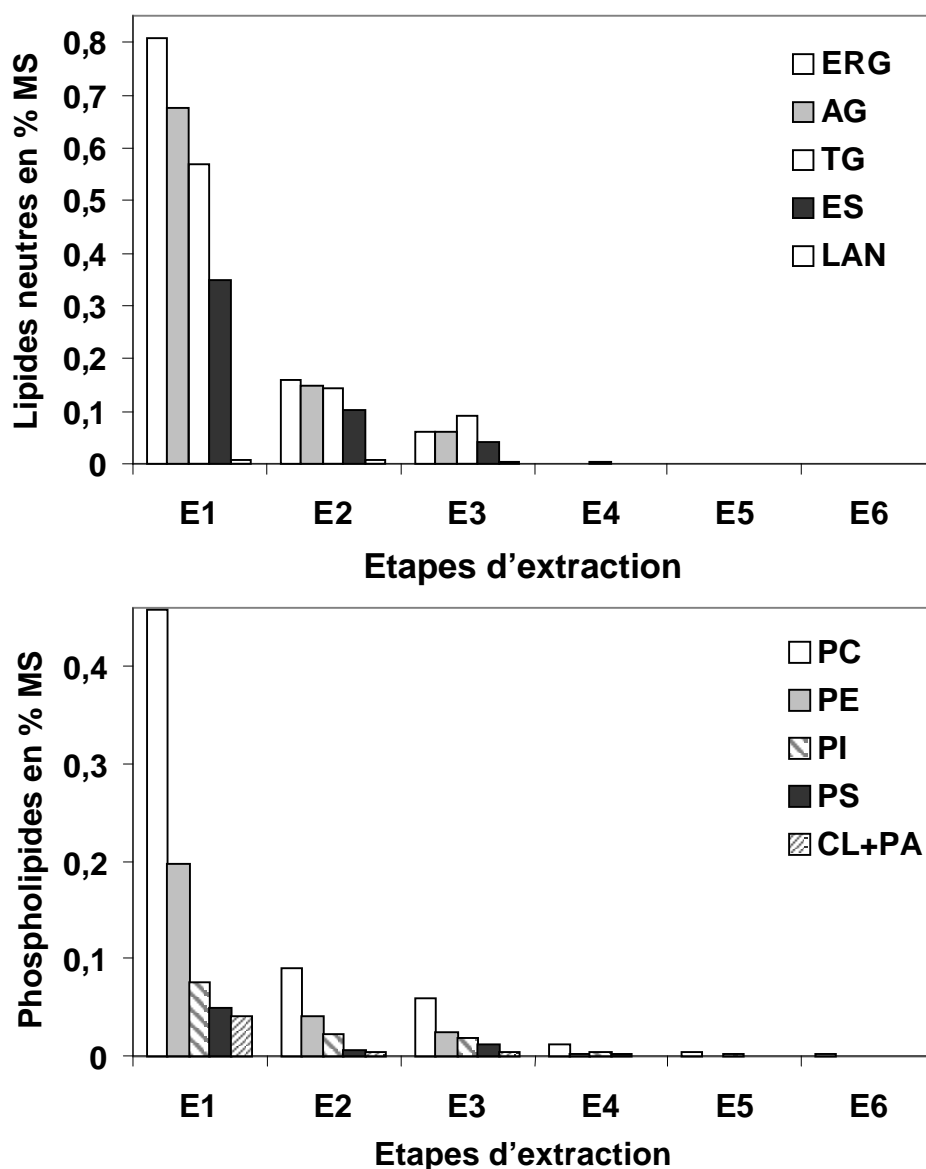


Figure 22 : Estimation du contenu en lipides, rapporté à la masse sèche (MS) de cellules, après chaque étape d'extraction (E1 à E6), mesuré par Chromatographie Couche Mince. ERG=ergostérol, AG=acides gras libres, TG=triglycérides, ES=esters de stérol, LAN=lanostérol, PC=phosphatidyl-choline, PE=phosphatidyl-éthanolamine, PI=phosphatidyl-inositol, PS= phosphatidyl-sérine, CL+PA= cardiolipides et acide phosphatidique.

Ensuite, nous voulions essayer de réduire le temps à 4 heures pour les deux premières et la dernière étape d'extraction et à une nuit pour la troisième extraction, de manière à pouvoir compiler la totalité de l'extraction sur deux jours. Les résultats du tableau 13 indiquent une meilleure efficacité de la plus longue extraction. Nous avons donc gardé quatre extractions d'une journée.

Tableau 13 : Quantité de lipides totaux ramenés au pourcentage de la masse sèche (% MS) de cellules et extraits suivant deux temps d'extraction : quatre étapes d'une journée ou deux étapes de 4h + une étape d'une nuit + une étape de 4h.

	4 extractions d'une journée	2 extractions 4h + 1 nuit + 4h
Lipides totaux (% MS)* déterminés par gravimétrie	7,07% (+/-0,3)	6% (+/-0,2)

\*moyenne sur 3 extractions

### II.1.ii. Optimisation de l'étape de lavage

De part la technique utilisée, une quantité non négligeable de débris cellulaires et d'acides aminés se retrouve avec l'extrait lipidique après extraction. Il faut donc effectuer une étape de lavage. L'étape de lavage est importante car elle doit purifier l'extrait sans perte de lipides.

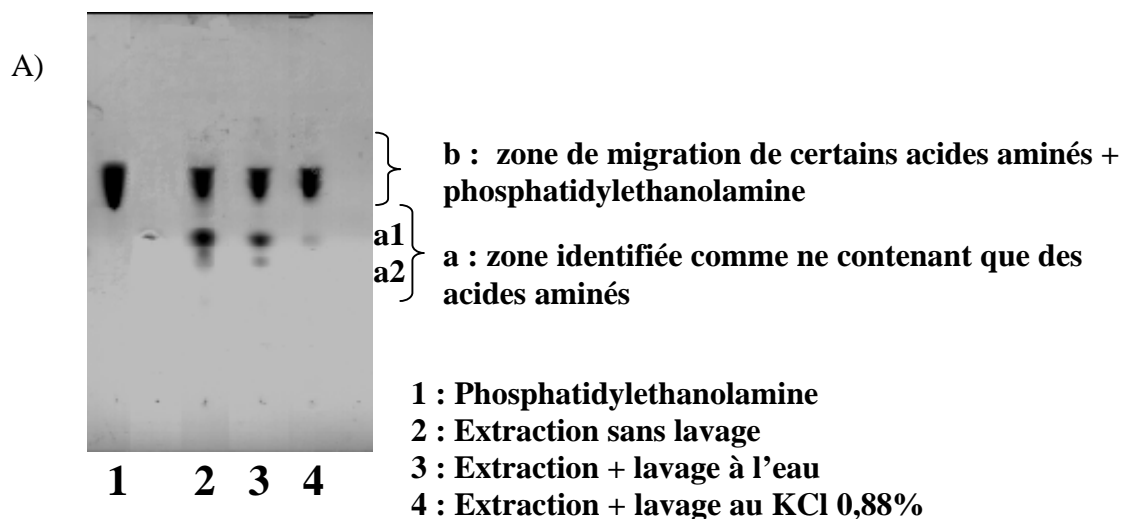
Nous avons testé deux types de lavages :

- Deux lavages successifs à l'eau mQ
- Deux lavages successifs au KCl 0,88%

Les deux types lavages sont comparables pour enlever les débris cellulaires. Cependant, il y a une nette différence quant à l'efficacité sur la présence d'acides aminés (cf. figure 23). Les acides aminés ont été visualisés par chromatographie couche mince. Le solvant de migration est un mélange butanol/acide acétique/H<sub>2</sub>O (40/20/20). La révélation se fait à la ninhydrine qui révèle tout composé ayant un NH<sub>2</sub> libre, comme les acides aminés mais aussi la phosphatidyl-étanolamine (PE). Sur la figure 23, deux zones de migration se distinguent : la zone a où se séparent au moins deux acides aminés présents dans les extraits lipidiques ; la zone b qui est la zone de migration de PE où certains acides aminés éventuellement présents n'ont pu être observés.

Sur les deux taches quantifiables attribuées à des acides aminés (cf. figure 23), les pourcentages d'acides aminés éliminés par les différents ont été estimés. Le lavage à l'eau a

permis d'éliminer environ 40% des acides aminés, contre plus de 90% pour le lavage au KCl. Au vu de son efficacité sur l'élimination des acides aminés, c'est le lavage au KCl qui a été retenu pour la suite des expériences.



B)

	% élimination	
	Lavage à l'eau	lavage au KCl
Acide aminé a1	35	92
Acide aminé a2	42	100

Figure 23 : Comparaison de l'effet du type de lavage sur l'élimination des acides aminés présents dans l'extrait lipidique. A) Chromatographie couche mince avec butanol/acide acétique/H<sub>2</sub>O (40/20/20) comme solvant de migration et révélation à la ninhydrine. B) Tableau récapitulatif des pourcentages d'élimination des acides aminés après deux lavages soit à l'eau, soit au KCl 0,88% (w/v).

Il faut que ce type de lavage n'élimine pas en même temps les lipides recherchés. Pour cela, les étapes de lavage ont été réalisées sur un mélange de standards. Les lipides récupérés ont été quantifiés par CCM. Les tableaux 14 et 15 présentent les pourcentages de récupération après deux lavages au KCl 0,88%. Compte-tenu de l'erreur de mesure par la technique utilisée qui est de l'ordre de 10%, la totalité des lipides présents avant lavage se retrouve après lavage au KCl 0,88%.

Tableau 14 : Pourcentage de récupération des différents lipides neutres après deux lavages au KCl 0,88%. DG=diglycérides, ERG=ergostérol, LAN=lanostérol, TG=triglycérides, ES=esters de stérol.

	<i>DG</i>	<i>ERG</i>	<i>LAN</i>	<i>TG</i>	<i>ES</i>
% Récupération*	108	105	94	107	109

\* Moyenne sur 2 essais

Tableau 15 : Pourcentage de récupération des différents phospholipides après 2 lavages au KCl 0,88%. PI=Phosphatidyl-inositol, PS= Phosphatidyl-sérine, PC=Phosphatidyl-choline, PG= Phosphatidyl-glycérol, PE=Phosphatidyl-éthanolamine, CL=cardiolipides et PA=acide phosphatidique.

	<i>PI</i>	<i>PS</i>	<i>PC</i>	<i>PG</i>	<i>PE</i>	<i>CL</i>	<i>PA</i>
% Récupération*	100	96	99	98	110	112	106

\* Moyenne sur 3 essais

### II.1.iii. Antioxydant

Compte tenu des temps d'extraction relativement longs, nous avons étudié l'utilité de rajouter un antioxydant, le BHT (Butyl-Hydroxy-Toluène), pour limiter, notamment, l'oxydation des phospholipides. Le BHT est rajouté à hauteur de 100 mg.l<sup>-1</sup> dans le solvant d'extraction.

Il n'y a pas d'interférence de l'antioxydant sur les résultats (cf. figure 24). Nous continuerons à rajouter le BHT, même si la figure 24 montre qu'il n'y a pas de différence de composition entre les extraits avec antioxydant et les extraits sans antioxydant.

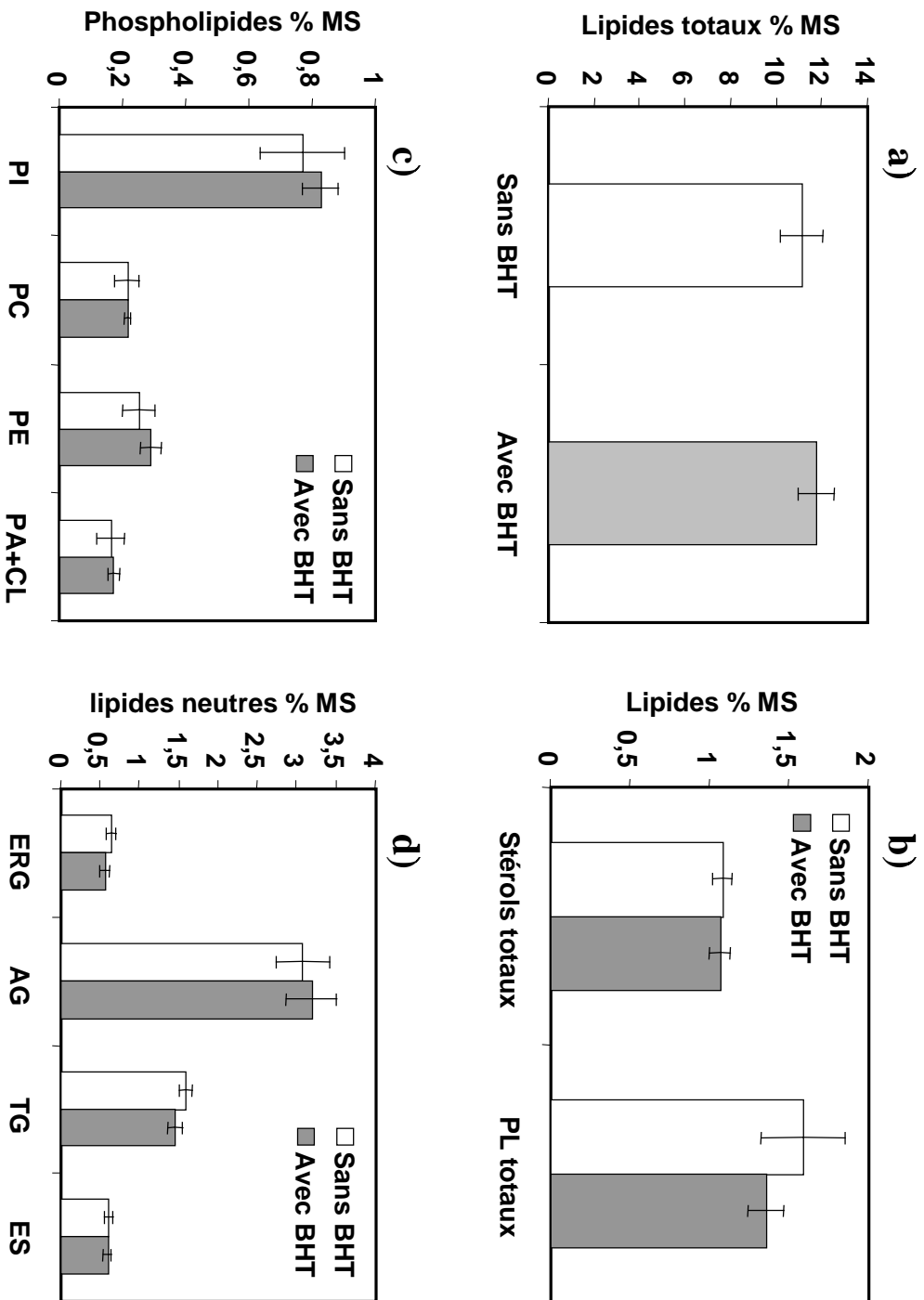


Figure 24 : Comparaison du pourcentage de lipid es extraits ramené à la masse sèche (% MS) de cellules avec ou sans utilisation d'antioxydant (BHT). a) lipides totaux obtenus par gravimétrie ; b) phospholipides totaux (PL totaux) et des stérols totaux obtenus par méthodes colorimétriques ; c) chaque phospholipide (PI=phosphatidylinositol, PC=phosphatidylcholine, PE=phosphatidyléthanolamine, CL+PA=cardiolipides et acide phosphatidique), et d) de chaque lipide neutre (ERG=ergostérol, AG=acides gras libres, TG=triglycérides, ES=esters de stérol) quantifiés par CCM.

## II.2. Reproductibilité

Nous devons évaluer la reproductibilité de notre méthode d'extraction en prenant en compte à la fois, les variabilités dues à la méthode d'extraction, et celles dues à la méthode de quantification choisie. Un même échantillon de cellules a été partagé en six échantillons de 500 mg chacun (cf. figure 25). Sur chacun de ces échantillons, l'extraction complète a été effectuée. Plusieurs techniques de mesure s'offrent à nous pour quantifier l'extrait lipidique. La reproductibilité mesurée va donc dépendre de la méthode de mesure :

- La gravimétrie : mesure des lipides totaux
- Deux méthodes colorimétriques : une pour le dosage des phospholipides totaux, l'autre pour le dosage des stérols totaux
- La CCM : séparation et quantification des différents composés

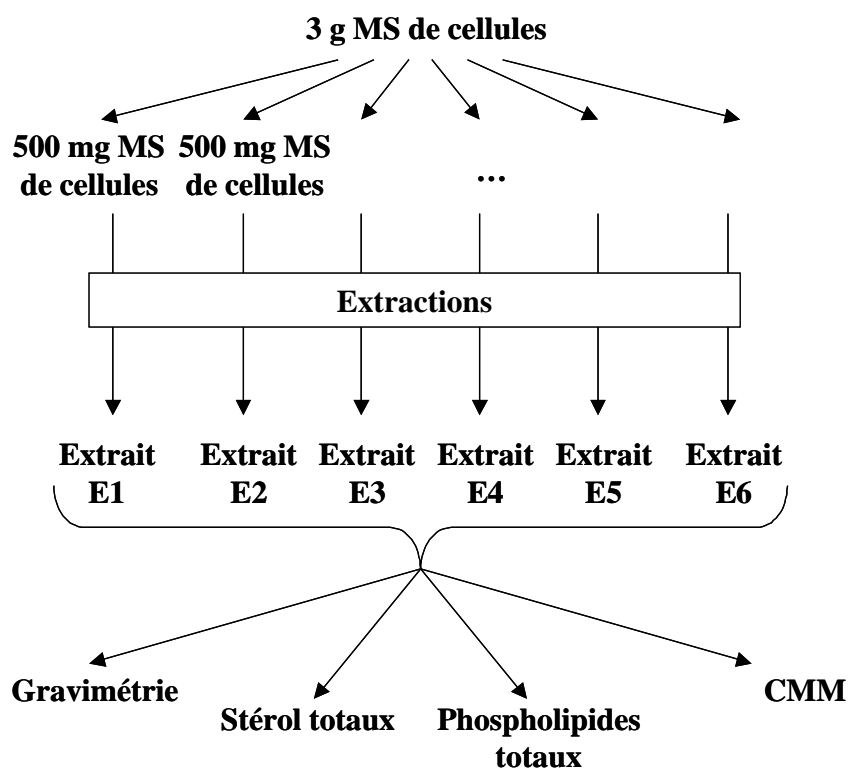


Figure 25 : Schéma récapitulatif de l'étude de la reproductibilité de l'extraction+quantification.

En cumulant les erreurs d'extraction avec les erreurs de mesure lors des quantifications, les variabilités restent raisonnables (cf. tableau 16). En effet, avec les mesures des lipides totaux,



stérols totaux et phospholipides totaux, les variabilités sont inférieures à 8%. Pour la mesure par CCM, les variabilités dépendent des composés et atteignent au maximum 12%.

De plus, les valeurs obtenues par les méthodes colorimétriques concordent avec les valeurs obtenues par CCM.

Par contre, il existe une différence non négligeable entre les lipides totaux obtenus par gravimétrie (12,4 % MS) et par cumul des différents composés par CCM (6,7 % MS). Cette différence est toujours observée quelles que soient les expériences.

Tableau 16 : Tableau récapitulatif des valeurs expérimentales pour chaque échantillon (E1 à E6), de la moyenne et de l'écart-type de ces valeurs, ainsi que le pourcentage que représente cet écart-type par rapport à la moyenne. Les lipides totaux sont obtenus par méthode gravimétrique. Les stérols totaux et les phospholipides totaux (PL totaux) sont obtenus par méthodes colorimétriques. Les lipides individuels sont quantifiés par CCM : PI=phosphatidylinositol, PC=phosphatidylcholine, PE=phosphatidyléthanolamine, CL+PA=cardiolipides et acide phosphatidique, ERG=ergostérol, AG=acides gras libres, TG=triglycérides, ES=esters de stérol. Les valeurs sont exprimées en pourcentage de la masse sèche de cellules (%MS)

		Valeurs expérimentales % MS						Moyenne % MS	Ecart-type % MS	Ecart-type % de la moyenne
		E1	E2	E3	E4	E5	E6			
lipides totaux (gravimétrie)		12,48	11,80	13,64	11,20	13,28	11,90	12,38	0,93	<b>7,5</b>
Stérols totaux		1,07	1,04	1,14	1,01	1,09	1,05	1,07	0,04	<b>4,1</b>
PL totaux		1,43	1,34	1,42	1,52	1,42	1,43	1,43	0,11	<b>7,6</b>
CCM	PI	0,83	0,87	0,82	0,90	0,76	0,79	0,83	0,05	<b>6,3</b>
	PC	0,21	0,22		0,22	0,21	0,22	0,22	0,004	<b>2,0</b>
	PE	0,29	0,29	0,29	0,31	0,31	0,25	0,29	0,02	<b>6,9</b>
	CL+PA	0,18	0,17	0,17	0,17	0,17	0,17	0,17	0,004	<b>2,5</b>
	ERG	1,02	1,14	1,17	0,96	1,10	0,95	1,06	0,09	<b>8,1</b>
	AG	2,83	2,86	3,24	3,34	3,81	3,04	3,19	0,37	<b>11,5</b>
	TG	1,47	1,30	1,37	1,57	1,55	1,44	1,45	0,10	<b>7,1</b>
	ES	0,05	0,05	0,05	0,05	0,04	0,06	0,05	0,00	<b>10,5</b>

Ecart-type estimé:  $S_{n-1} = \sqrt{\frac{\sum x_i^2 - nx^2}{n-1}}$  ; n=6 ;  $x_i$ = valeur de la grandeur pour l'échantillon  $E_i$  ;

$$\text{moyenne } \bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}$$

### II.3. Evaluation du rendement d'extraction

#### II.3.i. Sur solution de standards seuls

L'extraction complète est effectuée sur une solution contenant tous les standards de concentrations connues. Après extraction, les différents standards sont quantifiés par CCM. Cette expérience a été reproduite trois fois. Les résultats sont présentés dans les tableaux 17 et 18.

Tableau 17 : Rendements d'extraction sur solution de standards pour les différents lipides neutres. Il s'agit des quantités de standards recueillies après extraction exprimées en pourcentage des quantités de standards introduites au départ. DG=diglycérides, ERG=ergostérol, LAN=lanostérol, TG=triglycérides, ES=esters de stérol

	<i>DG</i>	<i>ERG</i>	<i>LAN</i>	<i>TG</i>	<i>ES</i>
% Récupération*	90	98	89	101	89

\* Moyenne sur 3 essais

Tableau 18 : Rendements d'extraction sur solution de standards pour les différents phospholipides. Il s'agit des quantités de standards recueillies après extraction exprimées en pourcentage des quantités de standards introduites au départ. PI=phosphatidyl-inositol, PS=phosphatidyl-sérine, PC=phosphatidyl-choline, PE=phosphatidyl-éthanolamine, PG=phosphatidyl-glycérol, CL+PA=cardiolipides et acide phosphatidique.

	<i>PI</i>	<i>PS</i>	<i>PC</i>	<i>PG</i>	<i>PE</i>	<i>CL + PA</i>
% Récupération*	89	102	112	105	96	109

\* Moyenne sur 3 essais

Les pourcentages de récupération des différents lipides se situent entre 89 et 112%. Sachant que l'erreur de mesure par CCM est de l'ordre de 10%, nous considérons que l'efficacité de récupération est correcte sur des solutions de standards seuls.

### II.3.ii. Sur solution de standards en présence de cellules

Comme vu précédemment, l'extraction n'induit pas de perte de standards sur des solutions contenant uniquement ces standards. Nous voulons maintenant confirmer que la présence de cellules lors de l'extraction ne va pas perturber l'efficacité de récupération des lipides.

Pour cela, des cellules sont mises en contact avec des quantités croissantes de standards. Une solution mère de chaque standard est utilisée à  $10 \mu\text{g}.\mu\text{l}^{-1}$ . De 0 à 5  $\mu\text{l}$  de ces solutions sont rajoutés aux cellules (cf. tableau 19).

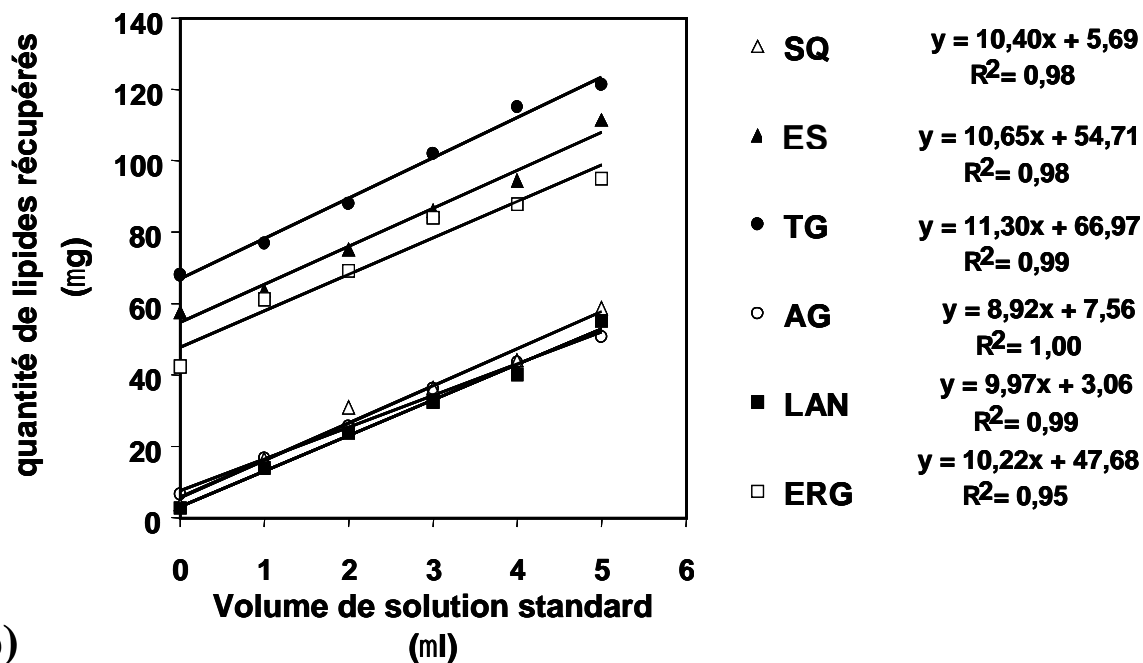
Tableau 19 : Mélange initial de chaque échantillon contenant des cellules de levures et différentes quantités de solution mère de chaque standard de lipides.

Echantillon	Masse sèche de cellules (mg)	Quantité rajoutée de chaque solution mère de standards ( $\mu\text{g}$ )
A	21,7	0
B	21,7	10
C	21,7	20
D	21,7	30
E	21,7	40
F	21,7	50

L'échantillon A sert à connaître la composition des levures. Les quantités globales de chaque composé récupérées après l'extraction sur les mélanges sont présentées dans la figure 26 pour les lipides neutres et pour les phospholipides. Le volume (en  $\mu\text{l}$ ) de solution standard rajoutée est reporté en abscisse. Les ordonnées correspondent à la quantité de lipides obtenue après extraction et quantification par plaque de CCM. La valeur à l'origine correspond à la composition de la biomasse utilisée, et la pente correspond à la concentration de la solution de standards rajoutée en  $\mu\text{g}.\mu\text{l}^{-1}$ , soit autour de 10. Nous avons des droites avec de bons coefficients de corrélation ( $R^2 > 0,95$ ), et avec une pente proche de la valeur attendue pour la concentration des solutions standards. Les tableaux 20 et 21 donnent une idée de l'écart entre la valeur théorique de la concentration de la solution de standards et la valeur expérimentale trouvée sur les graphiques.

En conclusion, la présence des cellules n'a pas perturbé la récupération des standards de lipides introduits avant l'extraction.

a)



b)

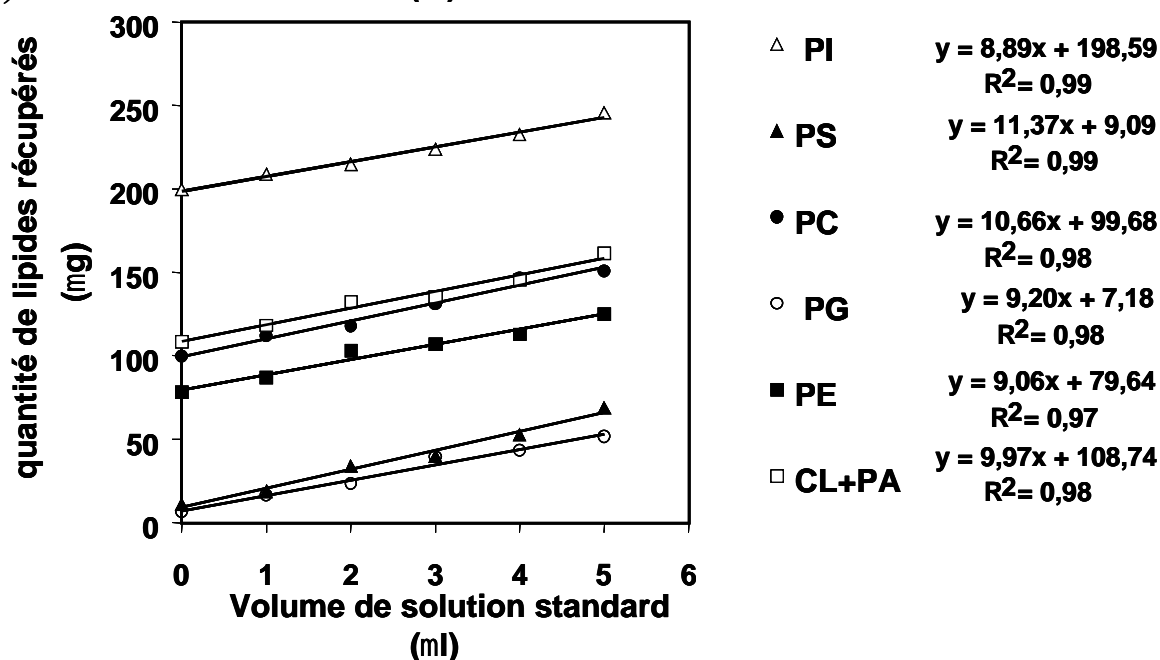


Figure 26 : Quantités de lipides récupérés après extraction complète en fonction du volume de solution de standards rajouté : a) pour les lipides neutres ; b) pour les phospholipides. SQ=squalène, ES=esters de stérols, TG=triglycérides, AG=acides gras libres, LAN=lanostérol, ERG=ergostérol, PI=phosphatidyl-inositol, PS=phosphatidyl-sérine, PC=phosphatidyl-choline, PE=phosphatidyl-éthanolamine, PG=phosphatidyl-glycérol, CL+PA=cardiolipides et acide phosphatidique.

Tableau 20 : Rapport entre les concentrations des standards mesurées expérimentalement et les valeurs théoriques introduites pour les différents lipides neutres. ERG=ergostérol, LAN=lanostérol, AG=acides gras libres, TG=triglycérides, ES= esters de stérols, SQ=squalène,

	ERG	LAN	AG	TG	ES	SQ
expérience/théorie	1,02	1,00	0,89	1,09	1,06	1,04

Tableau 21 : Rapport entre les concentrations des standards mesurées expérimentalement et les valeurs théoriques introduites pour les différents phospholipides. PI=phosphatidyl-inositol, PS=phosphatidyl-sérine, PC=phosphatidyl-choline, PE=phosphatidyl-éthanolamine, PG=phosphatidyl-glycérol, CL+PA=cardiolipides et acide phosphatidique.

	PI	PS	PC	PG	PE	CL+PA
expérience/théorie	0,89	1,09	1,07	0,93	0,91	0,97

### **III. Conclusion de la partie III**

Parmi les quatre méthodes que nous avons testées, nous avons choisi la méthode d'extraction par gradients de solvant (méthode 3) car elle répondait aux critères que nous nous étions fixés. Il n'y a pas de perte de lipides lorsque l'extraction est faite sur des solutions de standards (en présence ou non de cellules). Une quantité maximale de lipides est extraite des cellules. La reproductibilité est correcte. Et enfin, cette méthode propose un bon compromis au niveau de la rapidité et la simplicité de mise en œuvre.

Cette méthode a été optimisée en terme de temps d'extraction, de nombre d'étapes d'extraction, de la qualité du lavage et de l'ajout d'un antioxydant. La reproductibilité a été estimée pour chacune des méthodes de dosage utilisées. Pour la méthode gravimétrique nous avons eu une variabilité de 7,5%. Les variabilités liées aux méthodes colorimétriques sont respectivement de 4,1% et 7,6% pour les stérols totaux et pour les phospholipides totaux. Pour les dosages par chromatographie couche mince (CCM), les variabilités dépendent du composé et varient en 2 et 12%.

Parallèlement, cette étude a permis de valider nos méthodes de quantification. Les dosages colorimétriques sont cohérents avec les quantités mesurées par CCM. Cependant, la somme des composés identifiés par CCM ne correspond pas aux lipides totaux quantifiés par gravimétrie. Sur CCM, se retrouvent entre 50 et 70% des lipides totaux. En effet, nous ne quantifions pas tous les composés présents dans l'extrait. Il reste peut-être une petite quantité d'acides aminés que nous n'enlevons pas avec les lavages. De plus, certains lipides ne sont pas quantifiés, comme les glycolipides ou encore les protéolipides. En effet, l'utilisation des différents gradients de concentration en méthanol et en chloroforme doit permettre d'extraire un large spectre de lipides.

**Partie IV :**  
**Dynamique d'adaptation de la levure**  
***Saccharomyces cerevisiae* à sa**  
**production d'éthanol : aspects**  
**macrocinétique et microscopique**





L'hypothèse de départ de mon travail repose sur l'idée qu'un meilleur titre final en éthanol est dépendant de la capacité des cellules à résister à leur propre production élevée en éthanol. Par conséquent la problématique sous-jacente développée dans cette thèse est l'identification et la compréhension des modifications physiologiques permettant l'adaptation des levures à leur propre accumulation en éthanol. Pour atteindre cet objectif, cette partie explore le comportement macrocinétique des levures au cours du processus de fermentation. Ce comportement dépend des conditions des fermentations. Les fermentations sont suivies par les données macrocinétiques, que sont les concentrations en substrat (glucose) et produits (biomasse, éthanol, glycérol, acétate, succinate, lactate, ..) et par la viabilité cellulaire mesurée par coloration au bleu de méthylène. A partir de ces données sur plusieurs fermentations, nous avons identifié un paramètre important lié à la performance du procédé : la mesure de viabilité cellulaire au bleu de méthylène. Nous avons alors complété cette analyse microscopique par une mesure de l'activité métabolique des cellules par coloration au FUN 1 et par une analyse morphologique qui nous a permis de quantifier le comportement de plusieurs sous-populations de levures au cours de la production intensive d'éthanol.

## **I. Aspect macrocinétique des fermentations alcooliques de type fed-batch**

Les fermentations alcooliques présentées dans cette thèse ont été réalisées en mode fed-batch sur milieu synthétique (décrit dans la partie Matériel et Méthodes) utilisant le glucose comme substrat carboné et l'ammoniaque comme source d'azote. Outre les sels et les oligo-éléments initialement introduits dans le réacteur, des vitamines (acide pantothenique, acide nicotinique, méso-inositol, thiamine, pyridoxine, acide para-aminobenzoïque et biotine) sont aussi ajoutées de manière séquencée pendant la phase de croissance (cf. Matériel et Méthodes). Pendant la fermentation, plusieurs paramètres sont contrôlés et régulés : le pH à 4, la température à 30°C et l'agitation et l'aération pour maintenir une pression partielle en oxygène au-dessus de 20 %.

Ce type de fermentation se caractérise par un profil particulier en deux phases (cf. figures 27 et 28). Lors de la première phase, la production d'éthanol et de glycérol sont couplées à la croissance cellulaire. Le taux de croissance maximum est atteint dans les premières heures de la fermentation. Ensuite, le taux de croissance ne cesse de diminuer pour s'arrêter autour de 100 g.l<sup>-1</sup> d'éthanol (cf. figure 28). On observe ensuite le début de la seconde phase pendant laquelle la croissance cellulaire est arrêtée mais la production d'éthanol se maintient encore

pendant plusieurs heures. Cette dernière phase est appelée la phase de « découplage croissance-production ».

Quatre fermentations seront exploitées dans le cadre de cette thèse. Les quatre fermentations ont été conduites de manières très similaires. Le mode d'apport de glucose est le seul paramètre à avoir changé :

- Fermentation 1 : apport continu pour maintenir la concentration autour de  $50 \text{ g.l}^{-1}$  dans le réacteur
- Fermentation 2 : apport discontinu en trois ajouts de  $100 \text{ g.l}^{-1}$  et trois ajouts de  $50 \text{ g.l}^{-1}$
- Fermentation 3 : apport discontinu identique à la fermentation 2
- Fermentation 4 : apport discontinu en cinq ajouts de  $100 \text{ g.l}^{-1}$  et un ajout de  $50 \text{ g.l}^{-1}$

Il est à remarquer que les fermentations 2 et 3 sont censées avoir été conduites de la même manière, or elles conduisent à des performances très différentes (cf. figures 27 et 28 et tableaux 22 et 23). La productivité de la fermentation 2 est de  $3,3 \text{ g.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$  pour un titre final de  $147 \text{ g.l}^{-1}$  alors que pour la fermentation 3, le titre final est de  $120 \text{ g.l}^{-1}$  pour une productivité de  $2,7 \text{ g.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$ . Cette étude ne permet donc pas de mettre en évidence une influence du mode d'apport de substrat sur la performance. Par contre, elle révèle des problèmes de reproductibilité au niveau du procédé. Nous nous sommes donc focalisés sur les caractéristiques d'une bonne performance alcoolique.

La performance de ce type de procédé se caractérise d'un point de vue cinétique par la productivité et d'un point de vue plus globale par la concentration finale en éthanol obtenue. J'ai choisi de présenter d'abord l'aspect cinétique de ces fermentations afin de donner une vue d'ensemble des différentes étapes du procédé. Puis, je me focaliserai sur les performances de ces fermentations au bout de 45h et les performances finales, c'est-à-dire quand la production d'éthanol s'arrête.

### **I.1. Suivi cinétique des fermentations alcooliques de type fed-batch**

Les cinétiques de fermentations sont représentées ici par deux types de figures. La représentation classique consiste à tracer l'évolution des concentrations en substrats et produits de la fermentation en fonction du temps (cf. figure 27). La deuxième représentation, plus spécifique à notre étude, consiste à tracer l'évolution des vitesses de production en fonction de la concentration en éthanol (cf. figure 28).

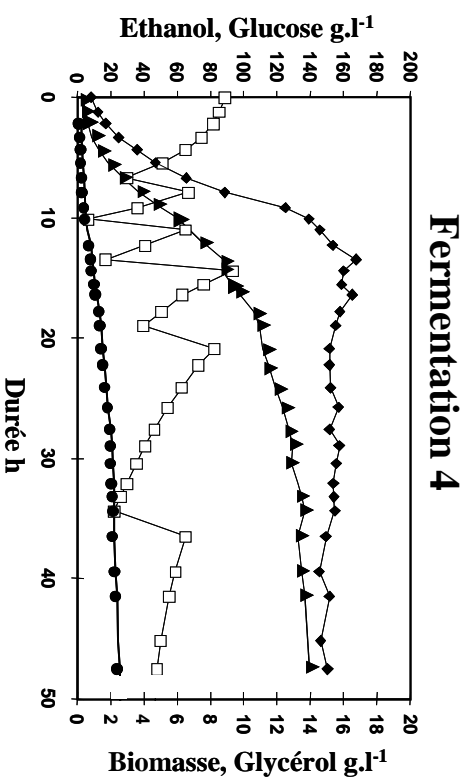
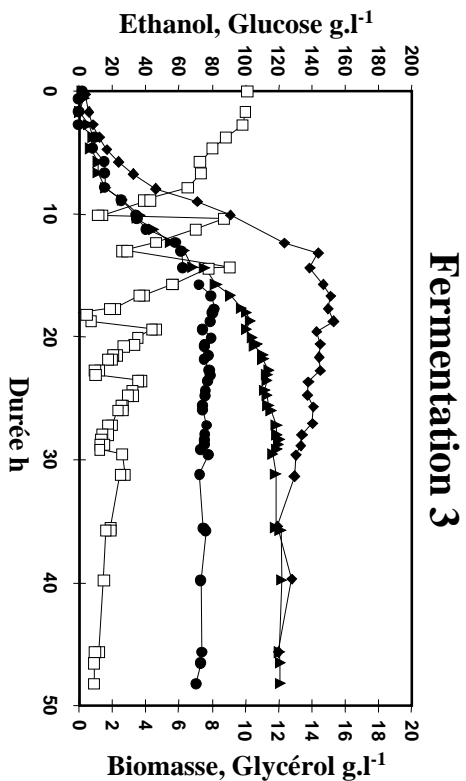
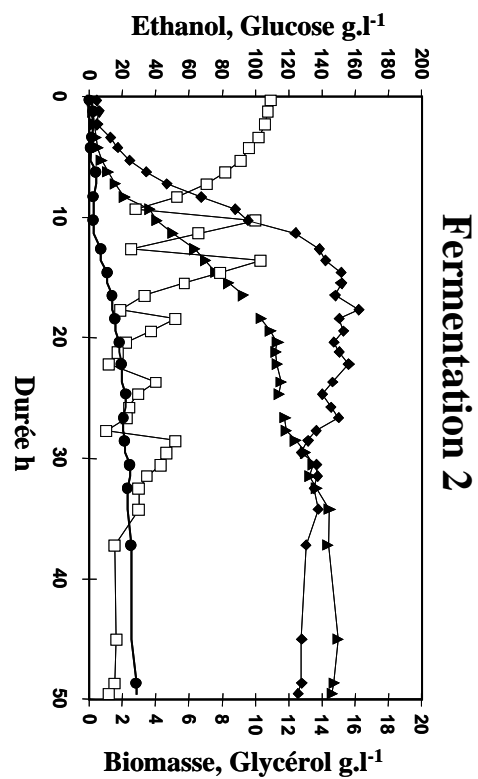
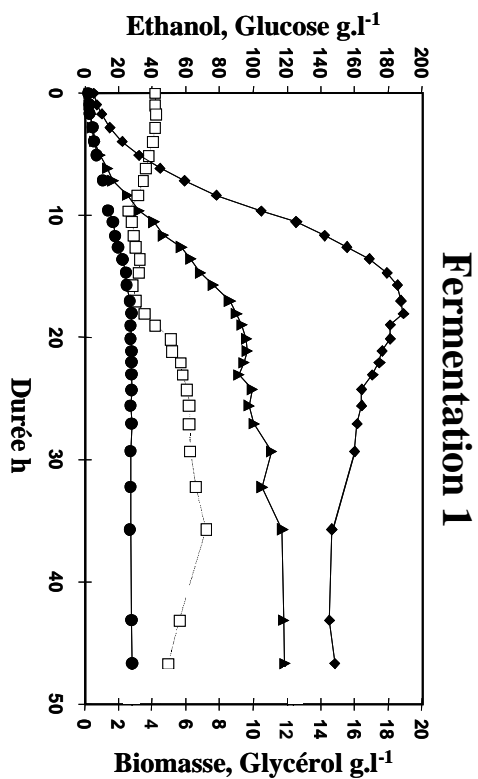


Figure 27 : Evolution des concentrations en glucose ( $\square$ ), biomasse ( $\triangle$ ), éthanol ( $\diamond$ ) et glycérol ( $\circ$ ) en fonction du temps de fermentation pour les quatre fermentations 1 à 4. Les conditions de ces quatre fermentations sont identiques à l'exception de l'apport de glucose :

Fermentation 1 : apport continu pour rester autour 50 g.l<sup>-1</sup> dans le réacteur

Fermentation 2 : apport discontinu en trois ajouts de 100 g.l<sup>-1</sup> et trois ajouts de 50 g.l<sup>-1</sup>

Fermentation 3 : apport discontinu identique à la fermentation 2

Fermentation 4 : apport discontinu en cinq ajouts de 100 g.l<sup>-1</sup> et un ajout de 50 g.l<sup>-1</sup>

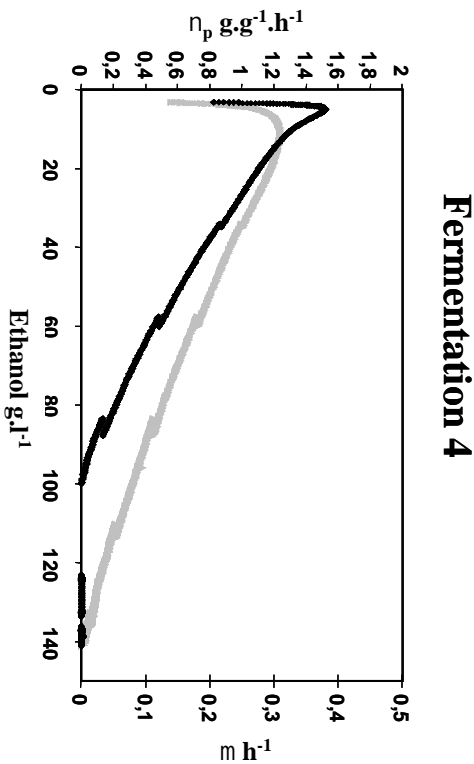
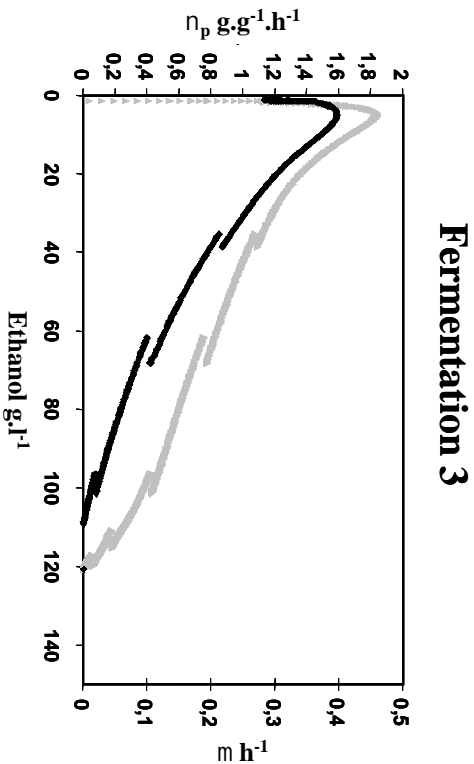
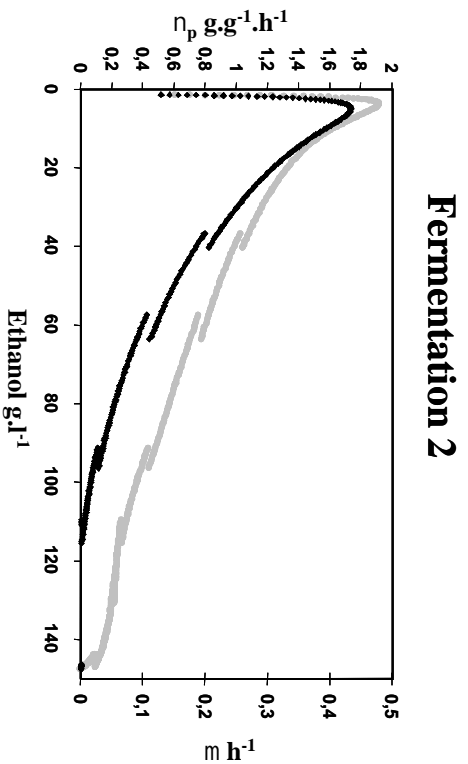
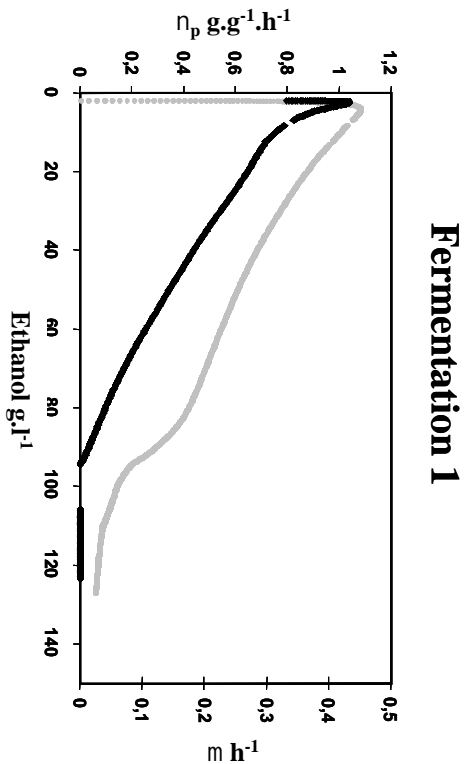


Figure 28 : Evolution de la vitesse spécifique de production d'éthanol  $\eta_p$  (—) et du taux de croissance  $\mu$  (—) en fonction de la concentration en éthanol dans le milieu pour les quatre fermentations 1 à 4. Les conditions de ces quatre fermentations sont identiques à l'exception de l'apport de glucose :

- Fermentation 1 : apport continu pour rester autour 50 g.l<sup>-1</sup> dans le réacteur
- Fermentation 2 : apport discontinu en trois ajouts de 100 g.l<sup>-1</sup> et trois ajouts de 50 g.l<sup>-1</sup>
- Fermentation 3 : apport discontinu identique à la fermentation 2
- Fermentation 4 : apport discontinu en cinq ajouts de 100 g.l<sup>-1</sup> et un ajout de 50 g.l<sup>-1</sup>

La vitesse spécifique de production  $v_p$  est la vitesse de production d'éthanol ramené à l'unité de biomasse. Le taux de croissance  $\mu$  est la vitesse de production de biomasse ramenée à l'unité de biomasse. Tracer les vitesses spécifiques de production d'éthanol  $v_p$  et de biomasse  $\mu$  (taux de croissance) dans le milieu en fonction de la concentration en éthanol permet de voir directement l'adaptation des levures à la présence d'éthanol et facilite la comparaison des performances du procédé en terme d'éthanol produit.

Sur cette dernière représentation, les deux phases du procédé apparaissent plus clairement. La première phase de croissance cellulaire couplée à la production d'éthanol dure environ 13 à 15 heures suivant les fermentations. La croissance s'arrête entre 95 et 111 g.l<sup>-1</sup> d'éthanol (cf. tableau 22). Cette phase est relativement similaire pour chaque fermentation que ce soit pour sa durée ou pour la concentration en éthanol atteinte au moment de l'arrêt de croissance. La concentration en éthanol atteinte au moment la croissance s'arrête s'appelle la concentration critique ou [éthanol]<sub>crit</sub>. Les fermentations 2 et 3 ont la même [éthanol]<sub>crit</sub>. En effet, ces deux fermentations ont des comportements macrocinétiques très semblables pendant la phase de croissance (cf. figures 27 et 28). Il n'y a pas de corrélation entre la performance du procédé et la durée de cette phase, ni avec la valeur de la concentration critique en éthanol, ni avec le taux de croissance moyen. En effet, Les taux de croissance moyens sont proches les uns des autres (comprise entre 0,182 et 0,192 h<sup>-1</sup>). La productivité moyenne pendant la croissance est la même quelles que soient les fermentations étudiées (1,7 g.l<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>) (cf. tableau 22).

Tableau 22 : Pour chacune des quatre fermentations décrites ci-dessus, ce tableau indique le taux de croissance  $\mu$  moyen sur 45h, la vitesse spécifique de production d'éthanol  $v_p$  moyenne sur 45h, la productivité sur 45h, la productivité depuis l'arrêt de la croissance jusqu'à 45h et la concentration en éthanol [éthanol]<sub>crit</sub> pour laquelle la croissance s'arrête.

Fermentation ([éthanol] <sub>45h</sub> )	$\mu$ moyen sur 45h h <sup>-1</sup>	$v_p$ moyen sur 45h g.g <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup>	Productivité sur 45h g.l <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup>	Productivité pendant le découplage g.l <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup>	[éthanol] <sub>crit</sub> g.l <sup>-1</sup>
Fermentation 1 (120 g.l <sup>-1</sup> )	0,187	0,32	2,8	1,1	95
Fermentation 2 (147 g.l <sup>-1</sup> )	0,182	0,56	3,3	1,6	111
Fermentation 3 (120 g.l <sup>-1</sup> )	0,184	0,47	2,7	1,0	109
Fermentation 4 (138 g.l <sup>-1</sup> )	0,192	0,38	3,1	1,4	100

En revanche, les différences deviennent notables au cours de la seconde phase de la fermentation. La phase de découplage est intéressante car la majorité du substrat consommé est transformé en éthanol. La productivité moyenne sur 45h varie entre  $2,7 \text{ g.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$  pour la fermentation 3, la moins performante, et  $3,3 \text{ g.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$  pour la fermentation 2, la plus performante. Comme les productivités sont les mêmes pendant la phase de croissance ( $1,7 \text{ g.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ), les différences de productivité sur 45h s'expliquent donc par des différences de productivité pendant la phase de découplage (cf. tableau 22). Cette phase apparaît donc primordiale pour la performance du procédé.

La productivité est caractéristique du procédé en terme de titre alcoolique et de rapidité pour l'obtenir. Par contre, les vitesses de production d'éthanol moyennes renvoient à l'efficacité de production de la biomasse. Elles ne corrélient pas nécessairement avec les performances en terme de productivité (cf. tableau 22). En effet, la fermentation 2 affiche une forte productivité moyenne ( $3,3 \text{ g.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ) et une bonne vitesse spécifique de production ( $0,56 \text{ g.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ), mais la fermentation 4 a permis d'atteindre aussi une bonne productivité ( $3,1 \text{ g.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ) mais la vitesse spécifique de production d'éthanol est beaucoup plus faible ( $0,38 \text{ g.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ). Plus de biomasse a été nécessaire pour maintenir la productivité dans la fermentation 4.

## **I.2. Analyse des titres et des rendements à 45h**

La fermentation la plus performante en terme de concentration finale en éthanol est la fermentation 2, avec un titre final de  $147 \text{ g.l}^{-1}$ . La moins performante est la fermentation 3, avec  $120 \text{ g.l}^{-1}$  (cf. tableau 23), pourtant identique à la fermentation 2 concernant le mode de conduite. La fermentation 4 donne une bonne performance proche de la fermentation 2, avec  $141 \text{ g.l}^{-1}$ . Le mode d'apport du glucose est très similaire pour ces deux dernières fermentations. La fermentation 1, avec  $127 \text{ g.l}^{-1}$ , présente une performance supérieure à la fermentation 3, mais nettement inférieure aux fermentations 2 et 4.

Dans la fermentation 1, la production de biomasse a très nettement été privilégiée avec  $21,6 \text{ g.l}^{-1}$ . Pour les autres fermentations, elles sont comprises entre  $15,4 \text{ g.l}^{-1}$  pour la fermentation 3 et  $16,7 \text{ g.l}^{-1}$  pour la fermentation 4. Les rendements par rapport à la biomasse confirment une orientation de l'utilisation de glucose vers la biomasse plus prononcée pour la fermentation 1 avec un rendement de  $0,050 \text{ g.g}^{-1}$ . Ces rendements sont sensiblement les mêmes pour les trois autres fermentations caractérisées par un apport séquencé de glucose (entre  $0,037$  et

0,040 g.g<sup>-1</sup> ; cf. tableau 24). L'orientation du métabolisme vers la production de biomasse ne permet pas d'expliquer les différences de performances.

Tableau 23 : Pour chacune des quatre fermentations décrites ci-dessus, ce tableau indique la concentration maximale en biomasse obtenue  $[X]_{\max}$ , le titre en éthanol au bout de 45 h de fermentation  $[\text{éthanol}]_{45\text{h}}$ , le titre maximal atteint  $[\text{éthanol}]_{\text{final}}$  et la concentration en glycérol au bout de 45 h de fermentation  $[\text{Gly}]_{45\text{h}}$ .

	$[X]_{\max}$ g.l <sup>-1</sup>	$[\text{éthanol}]_{45\text{h}}$ g.l <sup>-1</sup>	$[\text{éthanol}]_{\text{final}}$ g.l <sup>-1</sup>	$[\text{Gly}]_{45\text{h}}$ g.l <sup>-1</sup>
Fermentation 1	21,6	120	127	2,8
Fermentation 2	16,0	147	147	3,8
Fermentation 3	15,4	120	120	7,3
Fermentation 4	16,7	138	141	4,2

Tableau 24 : Pour chacune des quatre fermentations décrites ci-dessus, ce tableau indique les rendements Biomasse/Substrat ( $Y_{X/S}$ ) et Glycérol produit/Substrat ( $Y_{\text{Gly}/S}$ ) au moment de l'arrêt de croissance et le rendement Ethanol produit/Substrat ( $Y_{P/S}$ ) à 45h.

Fermentation ( $[\text{éthanol}]_{45\text{h}}$ )	$Y_{X/S}$ g.g <sup>-1</sup>	$Y_{P/S}$ g.g <sup>-1</sup>	$Y_{\text{Gly}/S}$ g.g <sup>-1</sup>
Fermentation 1 (120 g.l <sup>-1</sup> )	0,050	0,41	0,009
Fermentation 2 (147 g.l <sup>-1</sup> )	0,037	0,44	0,011
Fermentation 3 (120 g.l <sup>-1</sup> )	0,039	0,39	0,024
Fermentation 4 (138 g.l <sup>-1</sup> )	0,040	0,39	0,011

Le glycérol est le principal sous-produit de la fermentation alcoolique qui doit être au maximum minimisé pour optimiser la production d'éthanol. Dans tous les cas, la production de glycérol est couplée à la croissance. La production de glycérol est liée à la production de biomasse, car son rôle principal est le rééquilibrage de la balance redox (van Dijken et Scheffers 1986). L'accumulation de glycérol est minimale pour la fermentation 1. Le glycérol est aussi connu pour s'accumuler en cas de choc osmotique (Edgley et Brown 1983). En évitant les chocs osmotiques provoqués par l'apport de substrat, comme dans la fermentation 1, la concentration finale en glycérol est faible. Cependant, les fermentations 2, 3 et 4, qui ont les mêmes conditions de culture pendant la phase de croissance, n'ont pas le même comportement en terme de production de glycérol : 3,8 g.l<sup>-1</sup> pour la fermentation 2 contre 7,3 g.l<sup>-1</sup> pour la fermentation 3 et 4,2 g.l<sup>-1</sup> pour la fermentation 4. Donc l'apport de sucre et les chocs osmotiques qu'il engendre ne semble pas être ici le seul facteur influençant l'accumulation de glycérol. L'orientation du métabolisme vers la production de glycérol peut-

elle expliquer les différences de performance? La différence de rendement  $Y_{\text{Gly/S}}$  entre les fermentations 2 et 3 de  $0,013 \text{ g.g}^{-1}$  ne suffit pas à expliquer la différence de rendement  $Y_{\text{P/S}}$  de  $0,05 \text{ g.g}^{-1}$ . De plus, la fermentation 1 produit peu de glycérol ( $2,8 \text{ g.l}^{-1}$ ) pour une faible performance éthanologique ( $127 \text{ g.l}^{-1}$ ).

Donc, la performance en titre éthanologique ne corrèle ni avec l'orientation du métabolisme vers la biomasse, ni vers le glycérol.

### I.3. Conclusion

**Dans notre cas, la performance d'une fermentation est évaluée par sa productivité moyenne et son titre final en éthanol car ils reflètent au mieux la capacité d'adaptation de la levure.** Ce type de fermentation se déroule en deux phases : une phase de croissance et de production d'éthanol et une phase de découplage où l'éthanol continue d'être produit sans croissance cellulaire. Le titre final en éthanol est au moins de  $120 \text{ g.l}^{-1}$ . Cependant, deux fermentations, effectuées dans des conditions apparemment similaires, peuvent aboutir à des différences significatives de performances (titres finaux en éthanol compris entre  $120$  et  $147 \text{ g.l}^{-1}$ ). Pour toutes les fermentations étudiées, nous avons observé que la phase de croissance est relativement similaire. La phase de découplage entre croissance cellulaire et production d'éthanol est par contre très différente entre ces fermentations. L'efficacité de production pendant cette ultime phase corrèle avec les performances finales des fermentations. Bien que l'orientation de l'utilisation du glucose vers la formation de sous-produits, notamment le glycérol, diffère entre les fermentations, elle ne suffit pas à expliquer les différences de production d'éthanol. Les différences de performances peuvent alors être expliquées par un probable meilleur maintien de l'activité métabolique des cellules en présence d'éthanol pendant la phase de découplage. Pour valider cette hypothèse, il nous apparaît nécessaire de caractériser l'état physiologique des levures pendant la phase de croissance et la phase de découplage.



## **II. Analyse de la viabilité cellulaire, de la morphologie des cellules et de la composition macromoléculaire de la biomasse**

### **II.1. Analyse de la viabilité cellulaire au cours des procédés de production intensive d'éthanol**

#### **II.1.i. Méthode de mesure de la viabilité cellulaire**

Il existe plusieurs méthodes pour évaluer la viabilité cellulaire (Jones 1987a). Elles peuvent être basées sur la mesure de l'activité métabolique et/ou l'intégrité membranaire. D'autres méthodes se basent sur la capacité répliquative des cellules, comme le comptage sur boîte de pétri qui mesure la capacité de cellules à pouvoir former des colonies sur milieu gélosé. Dans le cas des fermentations étudiées, il est plus intéressant pour nous de connaître la part de population métaboliquement active, donc susceptible de produire encore de l'éthanol. Jones (1987a) conseille l'utilisation du bleu de méthylène dans le cas de fermentation alcoolique.

Mais que mesure-t-on exactement avec le bleu de méthylène ? Le principe de cette méthode repose sur le fait que le bleu de méthylène est une molécule organique, qui peut exister sous les deux formes : une forme oxydée (bleue) et une forme réduite (incolore). En contact avec le bleu de méthylène, certaines cellules se colorent en bleu, d'autres restent incolores ou « blanches » (cf. figure 29). Les cellules blanches sont dites viables, alors que les cellules bleues sont dites non viables.

Certains auteurs prétendent que ce colorant n'entre pas dans les cellules dont la membrane est intacte contrairement à des cellules dont la membrane est altérée (Bonora et Mares 1982; Kucsera *et al.* 2000). Une autre hypothèse suggère que le bleu de méthylène diffuse à l'intérieur des membranes et que les cellules encore métaboliquement actives sont capables soit d'excréter le bleu de méthylène, soit de l'oxyder (Millard *et al.* 1997). L'hypothèse de Jones *et al.* (1987a) est de considérer que le bleu de méthylène diffuse au travers des membranes et que cette diffusion dépend de la composition lipidique de la membrane. A l'intérieur des cellules, le colorant est alors oxydé par les activités oxydo-réductases si les cellules sont encore actives. La coloration des cellules dépend donc de l'équilibre entre le flux de pénétration du bleu au travers des membranes et la vitesse d'action des enzymes cellulaires (Jones 1987b).

Au cours de l'avancement de la fermentation alcoolique, nous observons une augmentation de la proportion de cellules colorées en bleu par le bleu de méthylène (cf. figure 31). Nous ne pouvons pas conclure si cette coloration provient d'une perte d'activité métabolique et/ou d'une perte d'intégrité membranaire. La mesure au bleu de méthylène comporte donc une incertitude sur son mode d'action, sans compter que certains auteurs décrivent un effet toxique de la molécule de bleu de méthylène (Bonora et Mares 1982). C'est pourquoi, nous avons décidé de comparer les résultats obtenus au bleu de méthylène avec un autre colorant mesurant l'activité cellulaire : le FUN<sup>®</sup> 1.

Les membranes cellulaires sont perméables au FUN<sup>®</sup> 1. Il s'agit d'un fluorochrome qui, dans des cellules actives, est internalisé sous forme de structures cylindriques intravacuolaires (appelées CIVS) rouges-oranges ou jaunes-oranges. Les cellules inactives sont colorées uniformément en vert-jaune intense et on n'observe pas de CIVS colorées en rouge-orange (Millard *et al.* 1997).

Par analyse d'image, nous pouvons identifier les cellules comportant des CIVS rouge-orange, correspondant aux cellules actives et les cellules considérées comme inactives qui fluorescent uniformément dans le vert (cf. figure 30).

La mesure de la viabilité par le FUN<sup>®</sup> 1 repose donc uniquement sur l'activité métabolique de la cellule (Millard *et al.* 1997).

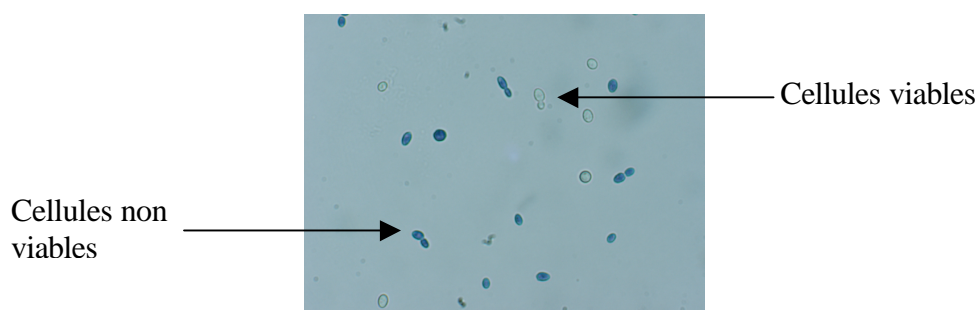


Figure 29 : Exemple de coloration au bleu de méthylène. La photo a été prise lors d'une fermentation alcoolique, avec 116 g.l<sup>-1</sup> d'éthanol.

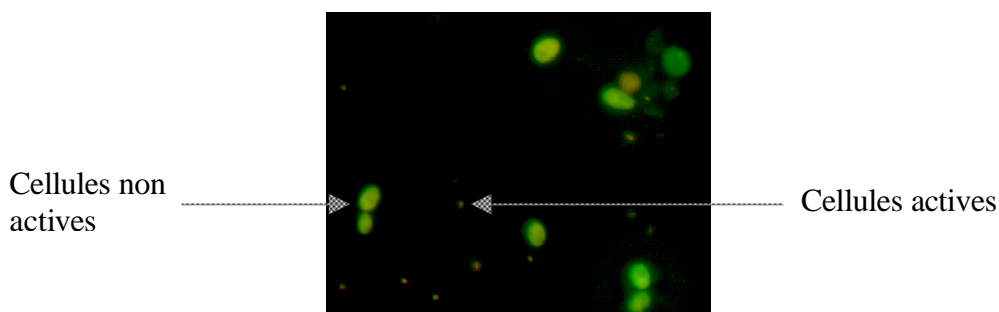


Figure 30 : Exemple de coloration au FUN<sup>®</sup> 1. La photo a été prise lors d'une fermentation alcoolique, avec 116 g.l<sup>-1</sup> d'éthanol.

Nous avons décidé de comparer les deux colorations lors d'une fermentation alcoolique de type fed-batch. Comme le montre la figure 31, il existe une bonne corrélation entre les deux colorations. La proportion de cellules qui se colorent en bleu en présence de bleu de méthylène est la même que celle des cellules qui apparaissent verte par coloration au FUN 1. Ceci confirme que la coloration des cellules par bleu de méthylène est associée à une perte de l'activité métabolique des cellules, dans nos conditions. Pour la suite de nos analyses, nous continuerons donc à utiliser le bleu de méthylène en raison de sa simplicité de mise en œuvre.

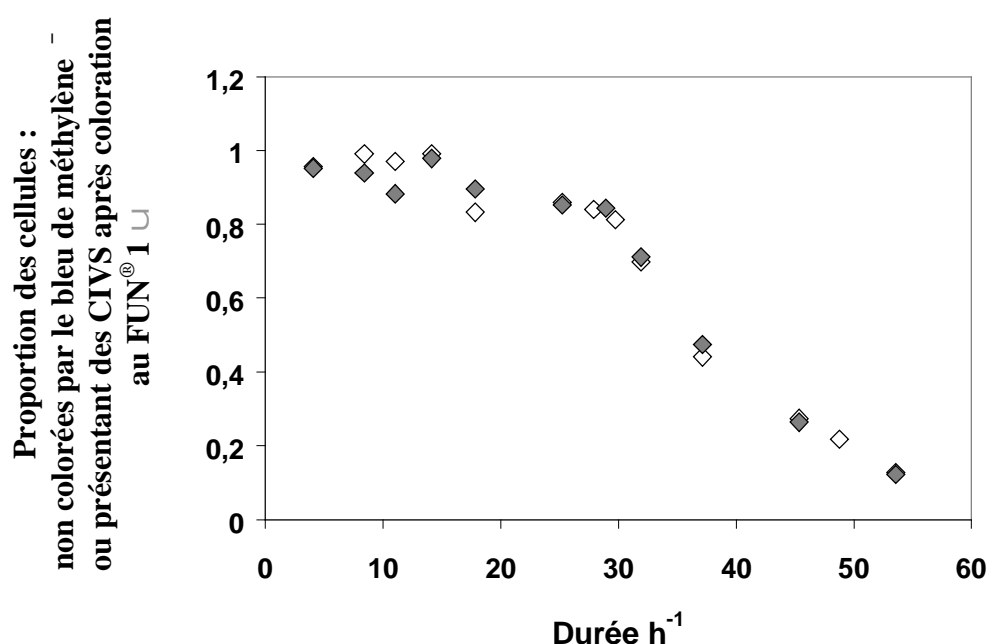


Figure 31 : Evolution de la proportion de cellules non colorées par bleu de méthylène (◼) et de la proportion de cellules présentant des CIVS après coloration au FUN<sup>®</sup> 1 (◻) au cours d'une fermentation alcoolique.

### **II.1.ii. Etat des cellules pendant les fermentations alcooliques par mesure de la coloration au bleu de méthylène**

Quelle que soit la fermentation étudiée, la proportion de cellules non colorées au bleu de méthylène diminue surtout en fin de fermentation. L'accumulation de cellules colorées au bleu de méthylène semble beaucoup plus régulière pour la fermentation 1 où le glucose est amené en continu que pour les fermentations avec apport discontinu de glucose où la viabilité fluctue beaucoup plus (cf. figure 32). Un apport continu de glucose semble maintenir plus longtemps la proportion de cellules non colorées au-dessus de 90%. En effet, pour les trois autres fermentations avec ajout séquentiel de glucose, il semble qu'il y ait une première diminution de cette proportion autour de 80 et 90 % puis elle se stabilise jusqu'à l'accumulation de 100 g.l<sup>-1</sup> d'éthanol dans le milieu. Par contre dès qu'elle passe au-dessous de 80%, sa chute est irrémédiable et provoque l'arrêt de la fermentation.

La performance finale en terme de titre éthanolique semble liée au maintien de la proportion de cellules non colorées par le bleu de méthylène. En effet, l'ordre dans lequel les courbes de la figure 32 passent au-dessous de 80%, est aussi l'ordre croissant des performances.

### II.1.iii. Conclusion sur la viabilité cellulaire

En fin de fermentation, la proportion de cellules qui se colorent par le bleu de méthylène augmente fortement. Par corrélation avec la coloration au FUN 1, nous pouvons conclure que ces cellules subissent une baisse de leur activité métabolique qui provoque l'arrêt de la production d'éthanol. Plus le moment où les cellules se colorent est retardé, plus la fermentation est performante. Donc, lorsque les levures s'adaptent mieux à l'accumulation d'éthanol, l'activité métabolique des levures se maintient. L'activité métabolique, par mesure de la coloration par le bleu de méthylène, sera assimilée dans notre cas à la mesure de la viabilité cellulaire.

Cependant, nous ne pouvons pas conclure sur les causes exactes de cette baisse de l'activité métabolique. Est-ce l'éthanol qui rentre dans les cellules et qui inhibe les activités enzymatiques ? Ou, est-ce que l'éthanol provoque des perturbations au sein de la membrane qui entraîneraient une disparition du gradient transmembranaire de protons nécessaires au maintien de l'activité métabolique ?

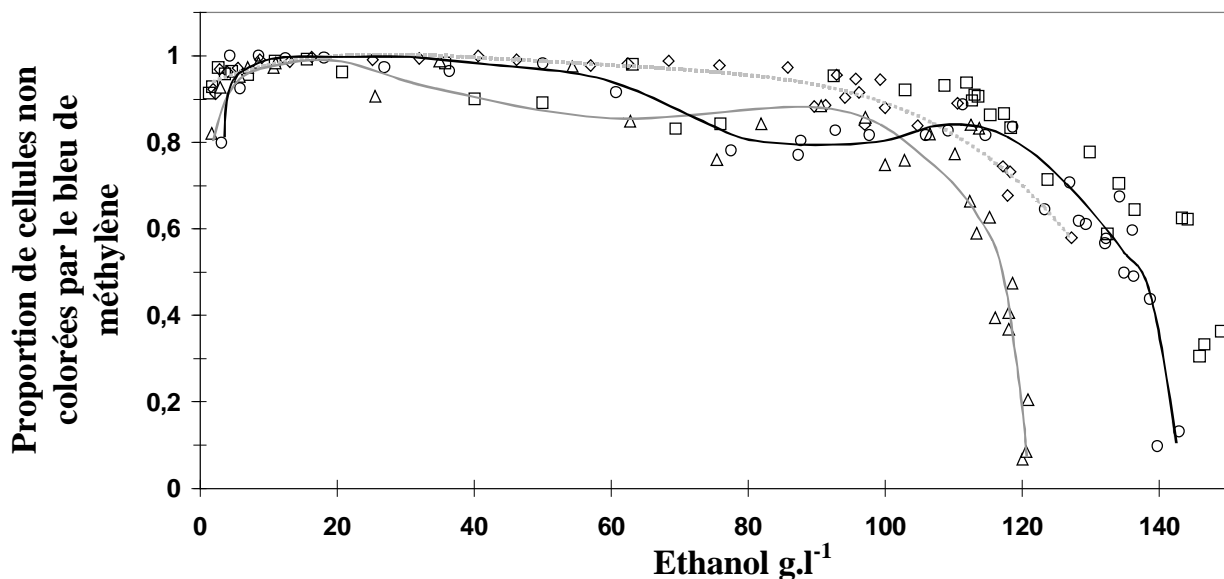


Figure 32 : Evolution de la proportion de cellules non colorées par le bleu de méthylène en fonction de la concentration en éthanol, pour chacune des quatre fermentations 1 à 4 :

Fermentation 1 (—) : apport continu pour rester autour 50 g.l<sup>-1</sup> dans le réacteur

Fermentation 2 (E) : apport discontinu en trois ajouts de 100 g.l<sup>-1</sup> et trois ajouts de 50 g.l<sup>-1</sup>

Fermentation 3 (r) : apport discontinu identique à la fermentation 2

Fermentation 4 (TM) : apport discontinu en cinq ajouts de 100 g.l<sup>-1</sup> et un ajout de 50 g.l<sup>-1</sup>

## II.2. Evolution de la morphologie des cellules pendant une fermentation

Le maintien d'une biomasse active, notamment au cours de la phase de découplage, semble être la clé d'une bonne performance. Pour cela, nous avons voulu mieux caractériser l'état morphologique de la population de levures au cours du procédé fermentaire.

Comme déjà décrit dans le premier chapitre de cette partie, les fermentations alcooliques par le procédé fed-batch se déroulent en deux phases. La première phase est la phase d'accumulation de la biomasse, couplée à la production d'éthanol. Lors de la deuxième phase, la croissance est arrêtée mais il y a toujours production d'éthanol. Pendant cette dernière phase, de plus en plus de cellules se colorent par le bleu de méthylène. La viabilité cellulaire se met à chuter ce qui va provoquer l'arrêt de la fermentation. Au moment où la viabilité chute, la population de levures devient de plus en plus hétérogène au niveau de la morphologie (taille, forme, bourgeonnement....). L'identification des différentes populations et leur évolution pendant les phases de fermentation procurent des indices quant à la compréhension des phénomènes physiologiques mis en place par la levure.

Nous avons utilisé un logiciel d'analyse d'image développé par Ohtani *et al.* (2004) qui permet d'identifier et de quantifier automatiquement le type de la cellule (cellule seule, cellule bourgeonnante et bourgeon) et la taille des cellules. A ces paramètres, nous avons rajouté un paramètre de brillance de la cellule (cf. partie 2 Matériel et Méthodes). En effet, lors d'une observation par microscopie à fond noir, certaines de nos cellules apparaissaient blanches (ou brillantes) et d'autres plus sombres avec juste le contour brillant (cf. figure 33).

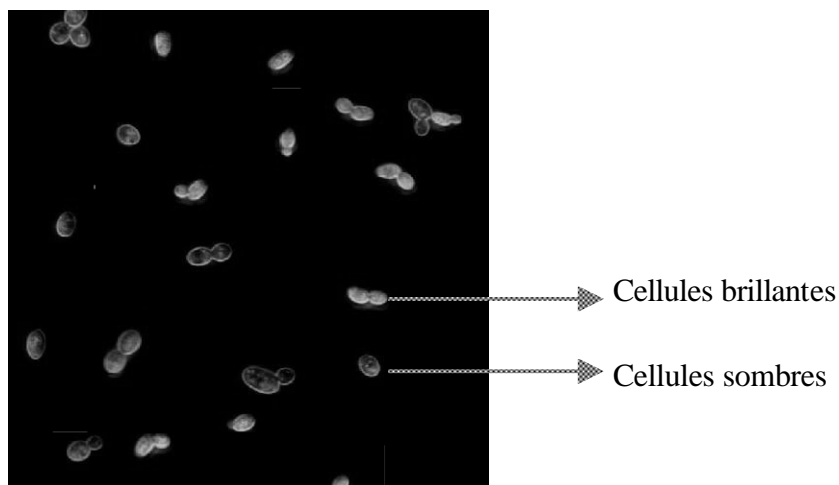


Figure 33 : Exemple de photos prises à l'aide d'un microscope à fond noir (Olympus BH2, objectif 40X, DplanApo40UVPL) équipé d'une caméra CCD (DXM 1200, Nikon). Photo prise pendant la fermentation 3. Lors de la prise de la photo la concentration dans le réacteur était de 118 g.l<sup>-1</sup>.

Cette étude morphologique a été réalisée uniquement sur la fermentation 3. Cette fermentation, avec apport séquencé de glucose, a permis d'atteindre 120 g.l<sup>-1</sup> d'éthanol en 45h (cf. figures 27 et 28 et tableau 22). Nous avons retenu les points de la fermentation où suffisamment de cellules ont pu être identifiées par le logiciel. Sept prélèvements (1 à 7), qui comptaient entre 170 et 350 cellules ayant une forme caractérisée, ont été retenus (cf. figure 34). Les prélèvements 1, 2 et 3 correspondent à la phase de croissance. Le prélèvement 4 se situe juste après l'arrêt de la croissance mais la proportion de cellules non colorées par le bleu de méthylène est encore au-dessus de 80%. Les prélèvements 5, 6 et 7 correspondent à des proportions de cellules non colorées par le bleu de méthylène de plus en plus faibles, respectivement 47, 37 et 20%.

### **II.2.i. Accumulation de cellules brillantes au cours de la fermentation**

Les cellules brillantes apparaissent au fur et à mesure de la production d'éthanol. L'évolution de la proportion de cellules brillantes suit l'évolution de la proportion de cellules colorées par le bleu de méthylène (cf. figure 34). L'étude en microscopie à fond noir des cellules brillantes ou sombres pourrait aussi permettre de suivre la perte de viabilité pendant la fermentation. Cependant, la proportion de cellules sombres semble toujours être légèrement supérieure à la proportion de cellules non colorées par le bleu de méthylène.

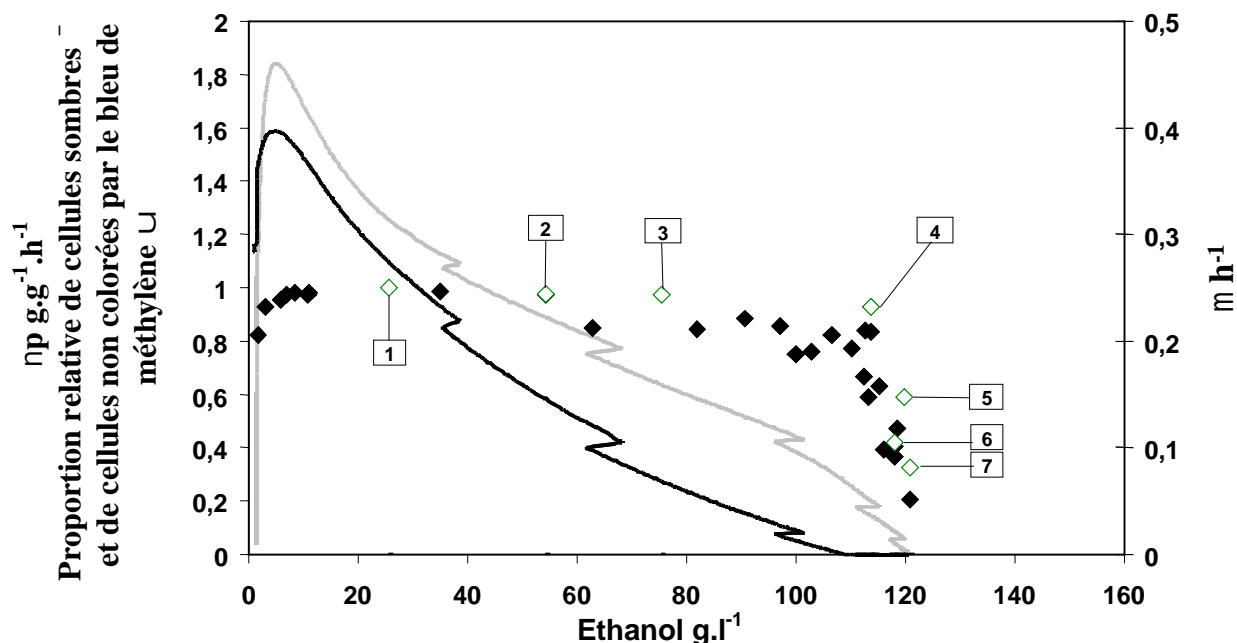


Figure 34 : Evolution, en fonction de la production d'éthanol au cours de la fermentation, du taux de croissance  $\mu$  (—), de la vitesse spécifique de production d'éthanol  $v_p$  (—), de la proportion relative de cellules non colorées au bleu de méthylène ( $\sqcup$ ) et de la proportion relative de cellules sombres ( $\blacksquare$ ).

Toutes les familles de cellules contiennent une part importante de cellules brillantes (cf. tableau 25). Il semble que les cellules non bourgeonnantes soient légèrement plus résistantes que les cellules bourgeonnantes, les plus fragiles étant les bourgeons. En effet, les premières cellules brillantes, qui apparaissent pendant la phase de croissance, appartiennent à la catégorie des cellules bourgeonnantes et des bourgeons. Pendant la phase de croissance, pour les prélèvements 2 et 3, 1 et 2 % respectivement des cellules bourgeonnantes et des bourgeons sont brillants (cf. tableau 25). Après l'arrêt de la croissance, des cellules non bourgeonnantes brillantes commencent à apparaître. 7% des cellules non bourgeonnantes sont brillantes au prélèvement 4. Dans toutes les familles, la proportion de cellules brillantes augmente avec l'avancement de la fermentation et de la coloration par le bleu de méthylène. Au dernier prélèvement, 65% des cellules non bourgeonnantes, 70 % des cellules bourgeonnantes et 72% des bourgeons sont brillants. Le pourcentage de cellules non colorées par le bleu de méthylène est alors de 20%. A partir de l'échantillon 4, juste après l'arrêt de croissance, il y a plus de bourgeons brillants que de cellules bourgeonnantes brillantes. Cela s'explique par l'apparition d'une classe de population où la cellule mère est sombre alors que



son bourgeon est brillant. Cette classe reste minoritaire et ne représente au maximum que 7 % des cellules bourgeonnantes, au prélèvement 6 (cf. tableau 25).

Tableau 25 : Evolution du pourcentage de cellules brillantes dans les échantillons n°1 à 7 (cf. figure 34) pour chacune des familles : cellules non-bourgeonnantes, bourgeonnantes et les bourgeons.

Echantillon n° (Ethanol g.l <sup>-1</sup> )	1 (25,6)	2 (54,3)	3 (75,4)	4 (114)	5 (120)	6 (118)	7 (120)
Cellules non-bourgeonnantes				7	37	53	65
Cellules bourgeonnantes	0	1	2	6	44	62	70
Bourgeons	0	1	2	10	51	75	72

La taille moyenne des cellules, calculée par le logiciel sans distinction de la brillance, passe de 358 pixels×pixels en tout début de fermentation à 441 pixels×pixels au prélèvement 4. Puis, elle rediminue jusqu'à 364 pixels×pixels au prélèvement 7. Il y a donc des changements dans la taille des cellules.

Les cellules sombres ont tendance à être de plus en plus grosses en avançant dans la fermentation. En effet, pour les cellules bourgeonnantes sombres, le pourcentage de grosses cellules augmente pendant la phase de croissance de 5 à 12 % et continue à augmenter après l'arrêt de la croissance à plus de 30% (prélèvements 4, 6 et 7) (cf. figure 35). L'augmentation de la taille des cellules sombres jusqu'au prélèvement 4 doit donc faire augmenter la valeur de la taille moyenne.

De plus, les cellules brillantes sont plutôt petites. En effet, pour des cellules bourgeonnantes, entre 50 et 100% des cellules brillantes sont petites (cf. figure 35). Pour les cellules non bourgeonnantes, il y a peu de petites cellules pendant la phase de croissance (8% des cellules sombres au prélèvement 3). Par contre, en fin de fermentation, entre 18 et 36% des cellules brillantes sont petites (cf. figure 35). L'augmentation des cellules brillantes qui sont de petite taille a donc tendance à faire baisser la valeur de la taille moyenne en fin de fermentation.

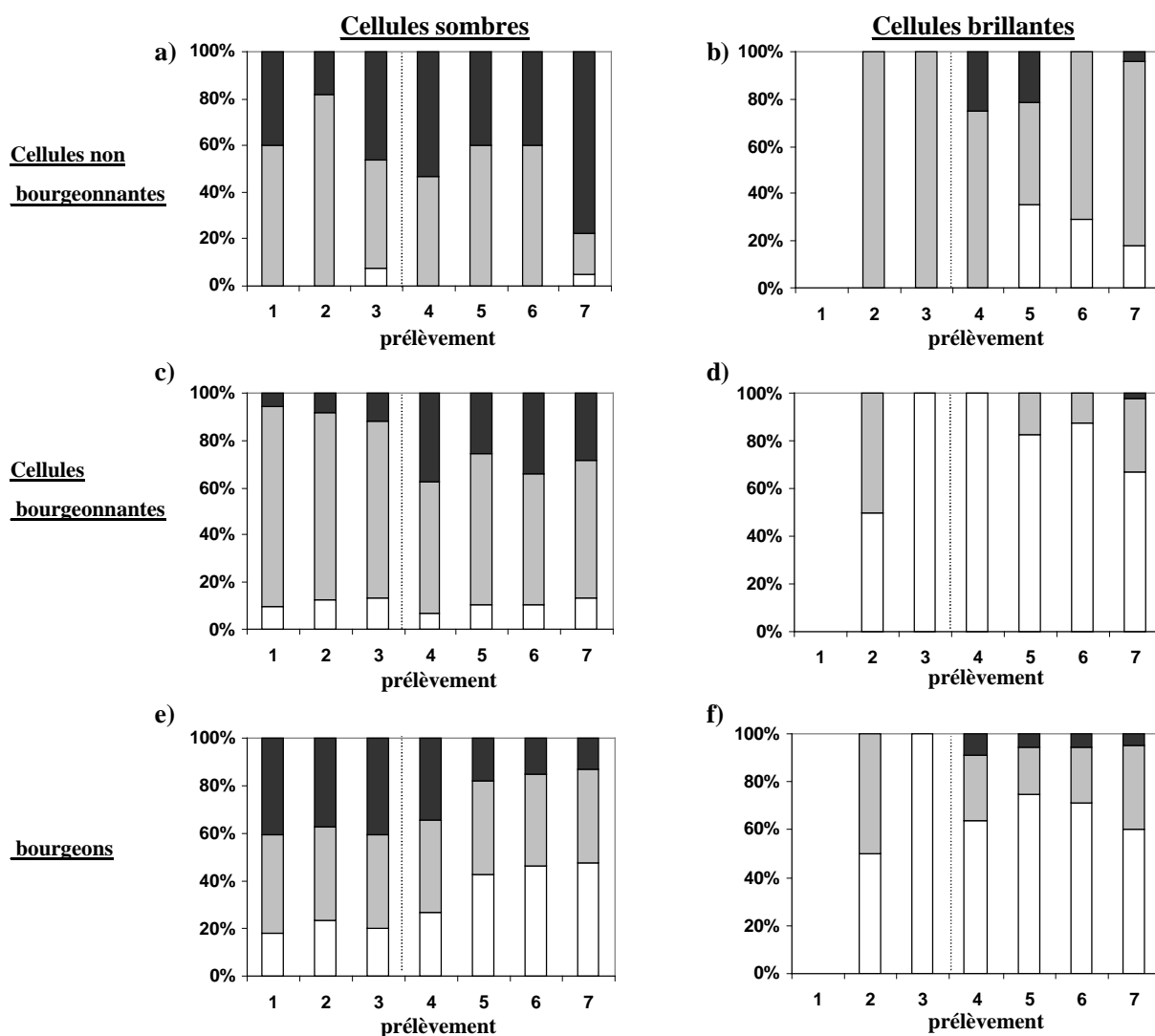


Figure 35 : Evolution des pourcentages de petites (₤), moyennes (₤) et grosses (₤) cellules pour chaque catégorie de cellules en fonction de leur brillance pour les prélèvements n°1 à 7 (1 : 25,6 g.l<sup>-1</sup> d'éthanol ; 2 : 54,3 g.l<sup>-1</sup> d'éthanol ; 3 : 75,4 g.l<sup>-1</sup> d'éthanol ; 4 : 114 g.l<sup>-1</sup> d'éthanol ; 5 : 120 g.l<sup>-1</sup> d'éthanol ; 6 : 118 g.l<sup>-1</sup> d'éthanol ; 7 : 120 g.l<sup>-1</sup> d'éthanol) (cf. figure 34). a) cellules non bourgeonnantes sombres ; b) cellules non bourgeonnantes brillantes ; c) cellules bourgeonnantes sombres ; d) cellules bourgeonnantes brillantes ; e) bourgeons sombres ; f) bourgeons brillants. ----- : arrêt de croissance qui sépare la phase de croissance de la phase de découplage.

## II.2.ii. Evolution de la répartition des différentes catégories des cellules (cellules non bourgeonnantes, cellules bourgeonnantes et bourgeons) au cours de la fermentation

Les cellules sont presque exclusivement bourgeonnantes en début de fermentation pendant la phase de croissance. 97% des cellules bourgeonnent au prélèvement 1 (cf. tableau 26). Les cellules sont de moins en moins bourgeonnantes suite à l'arrêt progressif de la croissance. Cependant, il reste près de 60% des cellules ayant un bourgeon en fin de fermentation, alors que la croissance est arrêtée.

Tableau 26 : Pourcentage de cellules bourgeonnantes en fonction des prélèvements n°1 à 7 (cf. figure 34) au cours de la fermentation alcoolique en mode fed-batch. Le pourcentage de cellules bourgeonnantes est calculé de la manière suivante :

$$\text{pourcentage.cellules.bourgeonnantes} = \frac{\text{Nombre.cellules.bourgeonnantes}}{\text{Nb.cellules.bourgeonnantes} + \text{Nb.cellules.non.bourgeonnantes}} \times 100$$

Echantillon n° (Ethanol g.l <sup>-1</sup> )	1 (25,6)	2 (54,3)	3 (75,4)	4 (114)	5 (120)	6 (118)	7 (120)
Cellules bourgeonnantes	97%	82%	76%	67%	58%	55%	61%

La proportion de gros bourgeons sombres diminue en fin de fermentation. Elle passe de 46% en début de fermentation (prélèvement 1) à 12 % en fin de fermentation (prélèvement 7) (cf. figure 34). Donc, les cellules bourgeonnantes en fin de fermentation ne sont-elles pas bloquées à un certain stade de division ? Les bourgeons arrivent-ils réellement à maturité ?




## II.2.iii. Conclusion :

Nous avons pu mettre en évidence la présence de cinq populations distinctes de cellules en toute fin de fermentation : des cellules non-bourgeonnantes, sombres ou brillantes; des cellules bourgeonnantes et leur bourgeon, sombres ou brillants et des cellules bourgeonnantes sombres avec un bourgeon brillant. Cette dernière population est très minoritaire et ne représente qu'au maximum 7 % des cellules totales. Or, en début de fermentation, la population de levures est homogène avec près de 97% de cellules bourgeonnantes. De plus, chaque population peut se subdiviser en trois sous-populations chacune en fonction de la taille des cellules : petites, moyennes, grosses. Nous avons étudié comment ces populations évoluaient au cours d'une fermentation.

A travers l'analyse microscopique, les changements dans la répartition des populations correspondent bien aux deux phases précédemment décrites (cf. tableau 27). Pendant la phase de croissance les cellules sont presque exclusivement sombres et bourgeonnantes avec une bonne répartition de la taille des bourgeons. A partir de l'arrêt de la croissance, des cellules brillantes commencent à apparaître en quantité non négligeable. L'apparition de ces cellules brillantes suit la coloration des cellules par le bleu de méthylène et donc ce que nous appelons la perte de viabilité cellulaire. De plus, ces cellules brillantes sont de petite taille. Nous faisons l'hypothèse que les cellules apparaissant brillantes sont des cellules perméabilisées et vidées de tout ou d'une grande partie de leur contenu cellulaire, c'est pourquoi elles apparaîtraient brillantes. Ces cellules mortes et vidées d'une partie de leur contenu cellulaire sont alors plus petites.

En fin de fermentation, les cellules sombres restantes sont plus grosses que les cellules sombres pendant la phase de croissance. Or un ajout de 6% d'éthanol dans le milieu crée un retard dans le cycle cellulaire des levures ce qui provoque une augmentation de leur taille (Kubota *et al.* 2004).

Tableau 27 : Tableau récapitulatif des populations rencontrées au court de chacune des phases de la fermentation alcoolique.

$\mu \neq 0 \Rightarrow$ Phase de croissance	$\mu = 0 \Rightarrow$ Phase de non-croissance et perte de viabilité
<p>- Population homogène : très grande majorité de cellules bourgeonnantes et sombres, de taille moyenne :</p>  <p>- toute taille de bourgeons</p> <p><math>\Rightarrow</math> observation caractéristique d'une phase de croissance cellulaire.</p>	<p>- population beaucoup plus hétérogène :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ des cellules brillantes et petites :  </li> <li>○ des cellules sombres moyennes et grosses :  </li> </ul> <p>- très peu de gros bourgeons et de plus en plus de cellules non bourgeonnantes.</p> <p>- de plus en plus de formes complexes qui correspondent à des agglomérats de cellules</p> <p><math>\Rightarrow</math> La croissance est arrêtée et la viabilité chute : les cellules apparaissant brillantes sont supposées perméabilisées pour expliquer leur diminution de volume</p>

### II.3. Etat de la composition macromoléculaire des cellules au cours de la production d'éthanol en mode fed-batch

Afin de compléter la caractérisation de la biomasse, nous avons déterminé des principaux composants macromoléculaires des levures au cours d'une fermentation (fermentation n°4, partie 4), en terme de teneurs totales en protéines, carbohydrates, lipides, et acides nucléiques (ADN+ARN). Les résultats sont présentés sur la figure 36.

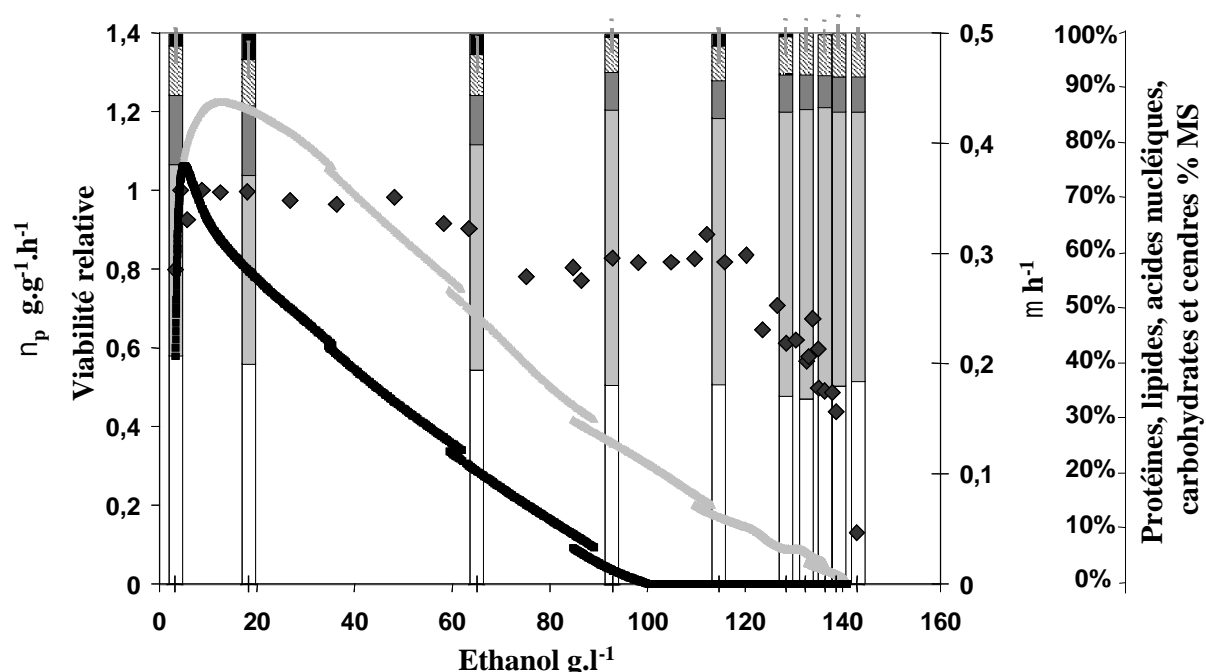


Figure 36 : Evolution du taux de croissance  $\mu$  (—), de la vitesse spécifique de production d'éthanol  $v_p$  (---), de la viabilité relative de cellules au bleu de méthylène (○) et des composants macromoléculaires en pourcentage de la masse sèche (% MS) en fonction de la concentration en éthanol : protéines (E), carbohydrates (C), ADN/ARN (F), lipides (G). Le reste pour faire une somme de 100% est assimilé aux cendres (H).

Les carbohydrates s'accumulent au détriment des protéines et des acides nucléiques (ADN+ARN). Ils passent de 35% en début de fermentation à 50 % de la masse sèche quand la viabilité commence à chuter. Puis, cette teneur reste constante jusqu'à l'arrêt du processus (cf. figure 36). Les deux principales sources de carbohydrates qui pourraient faire varier la teneur de manière aussi significative sont les sucres de réserves et les sucres pariétaux. Les contenus en sucres de réserves et pariétaux ont été mesurés afin de connaître l'origine de cette accumulation. Les résultats sont présentés dans la partie VI de cette thèse.

Les lipides diminuent pendant la phase de croissance. Ils passent de 9,2 à 6,3 % de la masse sèche, puis leurs teneurs réaugmentent à 8% pendant la phase de perte de viabilité.

Les cendres se calculent par rapport aux mesures de teneurs en macromolécules :

$$\% \text{ cendres} = 100 - (\% \text{ protéines} + \% \text{ acides nucléiques} + \% \text{ carbohydrates} + \% \text{ lipides})$$

Pendant la phase de perte de viabilité, il y a peu de cendres, alors qu'elles peuvent atteindre près de 10% pendant la phase de croissance. Il faut noter que les dosages de macromolécules donnent une estimation du contenu car pour chaque dosage nous prenons une molécule de référence (par exemple, la BSA pour le dosage des protéines) qui ne peut pas refléter la composition exacte de la biomasse. Les teneurs en cendres dépendent donc du dosage de tous les autres composants. Cette diminution de la teneur en cendres pourrait être due à la fuite d'une partie du contenu intracellulaire à cause d'une perméabilisation des membranes en fin de fermentation.

### III. Conclusion de la partie IV

Avec le type de fermentation fed-batch utilisé dans ce travail, nous pouvons atteindre de très importantes productions d'éthanol, pouvant aller jusqu'à 19 % (v/v) en 45 h (147 g.l<sup>-1</sup> d'éthanol). Ce mode de culture impose cependant un environnement très stressant pour la cellule. En conséquence, la performance de notre procédé en terme de production d'éthanol est fortement dépendante de la capacité de la levure à s'adapter à ces conditions extrêmes.

Une caractéristique intéressante de ce procédé est le découpage possible en deux phases : une première phase de croissance de la biomasse et de production d'éthanol et une deuxième phase de découplage croissance-production ( $\mu_{\text{biomasse}}=0$  mais  $v_{\text{éthanol}}\neq 0$ ) durant laquelle près d'un tiers de l'éthanol peut être produit (cf. I ; (Alfenore *et al.* 2002)). Une amélioration possible du procédé repose sur la capacité à maintenir cette phase de découplage. En effet, le découplage a toujours lieu quand l'éthanol atteint une concentration autour de 100 g.l<sup>-1</sup> ± 10 g.l<sup>-1</sup> et les différences de performances sont dépendantes du maintien de la viabilité cellulaire mesurée par coloration par le bleu de méthylène pendant la phase de découplage (Alfenore *et al.* 2002;Alfenore *et al.* 2004).

Dans ce travail, nous avons donc caractérisé des levures pendant cette phase par les colorations par le bleu de méthylène et le FUN<sup>®</sup> 1. Nous en concluons que les cellules subissent une perte d'activité métabolique qui est, du moins en partie, la cause de l'arrêt de production d'éthanol en fin de fermentation. Mais pour le moment, nous ne pouvons pas conclure sur la cause de cette perte d'activité. D'une part, l'éthanol est connu pour inhiber les

activités enzymatiques (Millar *et al.* 1982; Pascual *et al.* 1988). D'autre part, il perturbe au sein de la membrane le gradient transmembranaire de protons nécessaire au maintien de l'activité métabolique des cellules (Leao et van Uden 1984). Nous ne savons pas non plus si ces cellules sont définitivement mortes ou si elles maintiennent une activité résiduelle très faible.

Pendant la phase de perte de viabilité, la biomasse est de plus en plus hétérogène. Il y a très peu de débris cellulaires, les cellules gardent leur forme arrondie, seule leur taille et leur brillance en microscopie à fond noir évoluent : il n'y a pas lyse ou éclatement des cellules. Les cellules brillantes sont majoritairement des cellules petites, et leur accumulation dans le fermenteur suit la perte de viabilité mesurée au bleu de méthylène. Nous faisons l'hypothèse que ce sont des cellules mortes ou non actives, perméabilisées et vidées de tout ou partie de leur contenu intracellulaire. Cependant, cette diminution de volume pourrait aussi être attribuée à une augmentation de l'osmolarité du milieu (Blomberg 2000).

Les données présentées dans cette partie sur l'évolution de la morphologie des cellules pendant une fermentation ne sont qu'une première approche qui apporte des informations nouvelles sur l'enrichissement de populations au sein du fermenteur au cours de la production intensive d'éthanol. Cependant, il faudrait poursuivre ces investigations en utilisant le même outil d'identification automatique (avec le logiciel de Ohtani *et al.*, 2004) et en automatisant la prise de photos par microscopie en ligne pendant la fermentation (Zalewski et Buchholz 1996)





# **Partie V :**

## **Réponse transcriptomique des levures lors d'une fermentation de type fed- batch**



Les fermentations de type fed-batch étudiées dans ce travail s'arrêtent par perte de l'activité métabolique de cellules en fin de fermentation. Nous supposons que le maintien de cette activité dépend de la capacité de la levure à s'adapter aux fortes concentrations en éthanol. Mais quels sont les mécanismes que la levure met en place pour s'adapter à de telles concentrations en éthanol ? Une partie de la réponse peut être obtenue en étudiant la réponse transcriptionnelle de la levure au cours des fermentations. Pour cela, un suivi des profils d'expression de l'ensemble des ORFs au cours d'une fermentation alcoolique nous a permis de connaître les changements induits au niveau moléculaire par la levure lors de son adaptation à des concentrations croissantes de son propre éthanol produit. Après un traitement statistique des données, nous avons utilisé des méthodes de classification (par familles fonctionnelles, par localisation cellulaire, par clustering hiérarchique et par Self Organization Map), pour nous aider à faire ressortir les tendances métaboliques et physiologiques des mécanismes mis en place. Enfin, je me suis focalisée sur quelques points de ces données transcriptomiques qui me sont apparus pertinents en rapport avec la littérature et avec les modifications des caractéristiques de la biomasse décrites dans la partie IV.

## **I. Présentation du plan expérimental :**

### **I.1. Choix de la fermentation et des prélèvements pour le suivi cinétique**

La fermentation choisie pour cette étude est une des fermentations de type fed-batch présentées dans la partie IV. Il s'agit de la fermentation 1. La souche CBS8066 est cultivée sur milieu synthétique avec un apport séquencé de vitamines. L'apport de glucose a permis de maintenir une concentration en glucose dans le réacteur autour de  $50\text{g.l}^{-1}$ , en évitant les chocs osmotiques. La concentration maximale de  $127\text{ g.l}^{-1}$  d'éthanol a été obtenue après 52 heures de fermentation (cf. figure 37).

Le choix de la fermentation a été orienté par le mode d'apport de glucose. En limitant les chocs osmotiques, nous souhaitons éviter de rajouter des éléments perturbateurs au système d'étude.

L'analyse globale des profils d'expression des gènes a été réalisée grâce à la technique des puces à ADN. Les données macrocinétiques nous ont guidés sur le choix des prélèvements à analyser afin de décrire la dynamique d'adaptation de la levure aux fortes concentrations en éthanol. Six prélèvements successifs (1 à 6) ont été choisis. Le prélèvement **1** est

l'échantillon de référence. Les cellules sont en croissance à faible concentration d'éthanol ( $17 \text{ g.l}^{-1}$ ). Le prélèvement 2 est intermédiaire. La concentration en éthanol est plus importante ( $65 \text{ g.l}^{-1}$ ), mais les cellules sont encore en phase de croissance. Les prélèvements 3, 4 et 5 entourent l'arrêt de la croissance cellulaire, avec respectivement 90, 95 et  $100 \text{ g.l}^{-1}$  d'éthanol. Au prélèvement 6, le taux de croissance  $\mu$  est nul ( $\mu=0$ ), et la vitesse de production d'éthanol  $v_p$  est faible mais pas nulle. La concentration en éthanol est de  $125 \text{ g.l}^{-1}$  mais la viabilité n'est plus que de 60 %.

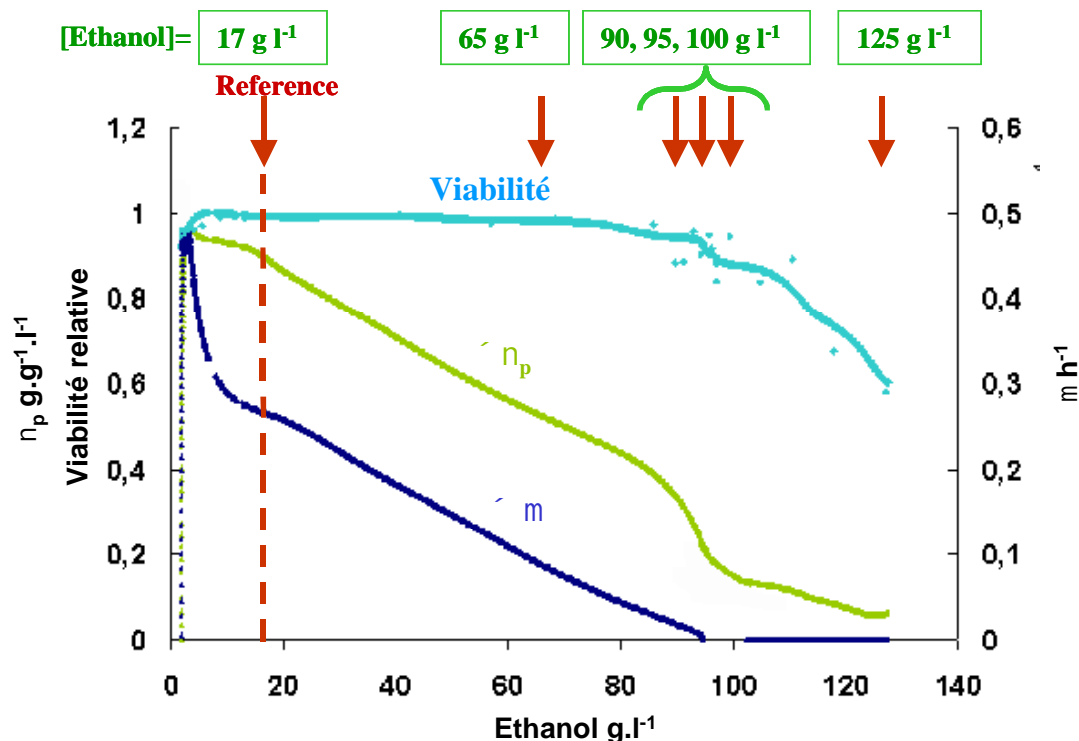


Figure 37 : Evolution du taux de croissance  $\mu$  (—), de la vitesse spécifique de production d'éthanol  $v_p$  (—) et de la viabilité mesurée par coloration au bleu de méthylène (— - —) en fonction de la concentration en éthanol.

Le choix de l'échantillon de référence est crucial pour l'interprétation des résultats. Les changements observés seront étudiés par rapport à référentiel. Comme nous étudions une cinétique, il semble plus intéressant de comparer les différents temps de fermentation avec un temps de référence en début de fermentation, quand les cellules sont en pleine croissance. L'idéal serait de choisir des cellules lorsque la croissance est maximale. Le taux de croissance  $\mu$  est maximal très tôt dans la fermentation. Or, il ne faut pas prendre le référentiel trop tôt à cause de l'influence de l'état physiologique dans l'inoculum et de la phase de démarrage. De plus, lorsque  $\mu$  est maximal, la concentration cellulaire dans le réacteur est très faible. Il ne

doit pas non plus être pris trop tard car cet échantillon doit correspondre à une concentration faible en éthanol. Le choix de l'échantillon 1 nous est apparu comme un bon compromis (cf. figure 37).

## I.2. Stratégie et traitement statistique

Les lames utilisées pour ce travail sont des dendrilames (Le Berre *et al.* 2003). Ce sont des lames de verres sur lesquelles ont été déposés 6074 ORFs en duplicat, sous forme de fragments PCR qui représentent l'ensemble du génome de *Saccharomyces cerevisiae*.

Pour chaque échantillon, trois lames indépendantes ont été réalisées en comparant la condition choisie à la condition de référence prise en début de fermentation (cf. figures 37 et 38). Ce type de lame permet en marquant chaque condition avec un fluorochrome différent de visualiser directement le différentiel sur la lame. Nous avons toujours marqué la condition de référence avec du Cy5 et les autres conditions avec du Cy3. Or, par cette méthode, nous ne tenons pas compte des différences d'incorporation de chaque fluorochrome au sein d'un gène. Il aurait fallu faire des répétitions en inversant les marquages Cy5 et Cy3 pour la condition de référence et la condition comparée, c'est-à-dire faire un « dye swap ».

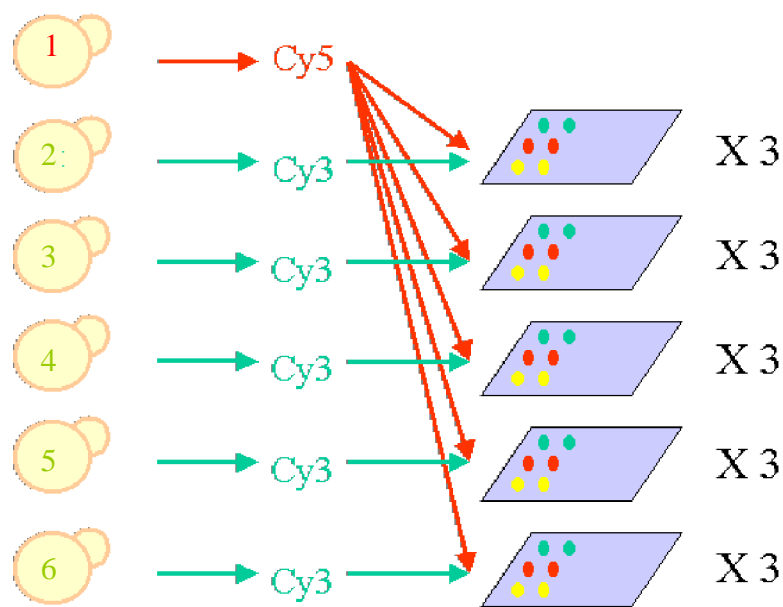


Figure 38 : Schéma expérimental de la stratégie adoptée pour le marquage et l'hybridation des six échantillons (1 à 6).

**De part la stratégie adoptée, tous les ratios sont exprimés par rapport à l'échantillon de référence (échantillon n°1) à 17 g.l<sup>-1</sup> d'éthanol.**

Sur chaque lame et pour chaque ORF, le ratio Cy3/Cy5 a été normalisé. Ensuite la moyenne de ces ratios a été calculée sur les trois lames identiques pour chaque condition. Sur les données normalisées, un test de Student a été appliqué afin d'identifier les gènes différentiellement exprimés de manière significative. **Le seuil de significativité choisi a été un seuil de probabilité de 5%.**

Le gène est différentiellement exprimé de manière significative si la probabilité associée est inférieure à 5%. A ce moment-là, il y a moins de 5% de chance que les gènes apparaissent différentiellement exprimés à cause du hasard ou des erreurs expérimentales.

## II. Analyse des résultats

### II.1. Description globale des changements transcriptionnels

Les premiers résultats montrent que près de 25% des 6074 ORFs présents sur la puce se retrouvent différentiellement exprimés (test de Student significatif à 5%) (cf. tableau 28) à au moins un moment de la fermentation.

Tableau 28 : Nombre de gènes différentiellement exprimés (test de Student significatif à 5%) et % du génome correspondant aux différents temps comparés au temps de référence.

Echantillons	temps 2/1	temps 3/1	temps 4/1	temps 5/1	temps 6/1
Nombre de gènes	750	1540	1495	1690	1750
% du génome	12%	25%	25%	28%	29%

Pour différencier les gènes sur-exprimés et sous-exprimés, nous ne nous sommes intéressés qu'aux gènes significativement différents et ayant un ratio de sur-expression supérieur à 1,8 ou de sous-expression inférieur à 0,55. En effet, par une expérience préliminaire, nous avons montré qu'avec une erreur expérimentale globale moyenne de 30%, une différence d'expression peut être détectée à partir d'un ratio de 1,8 (cf. partie II « Matériel et méthodes » pour le choix de ce seuil).

Pour la majorité des gènes sous-exprimés, ils sont réprimés très tôt dans la fermentation, car le nombre de gènes sous-exprimés évolue peu au cours de la fermentation (cf. tableau 29 et figure 39). Ils représentent entre 2 et 3 % du génome.

Par contre, peu de gènes sont sur-exprimés aux échantillons 2 et 3, voire 4. Le nombre de gènes sur-exprimés explose après l'arrêt de la croissance, au niveau de l'échantillon 5 (cf. tableau 29 et figure 39). A ce moment-là, près de 5,5 % des ORFs présentent une sur-expression.

Tableau 29 : Nombre de gènes différentiellement exprimés (test de Student significatif à 5%) dont le ratio est soit  $>1,8$  pour les gènes sur-exprimés, soit  $<0,55$  pour les gènes sous-exprimés.

Echantillons	temps 2/1	temps 3/1	temps 4/1	temps 5/1	temps 6/1
ratio $>1,8$	45	75	130	337	223
ratio $<0,55$	122	183	146	171	194

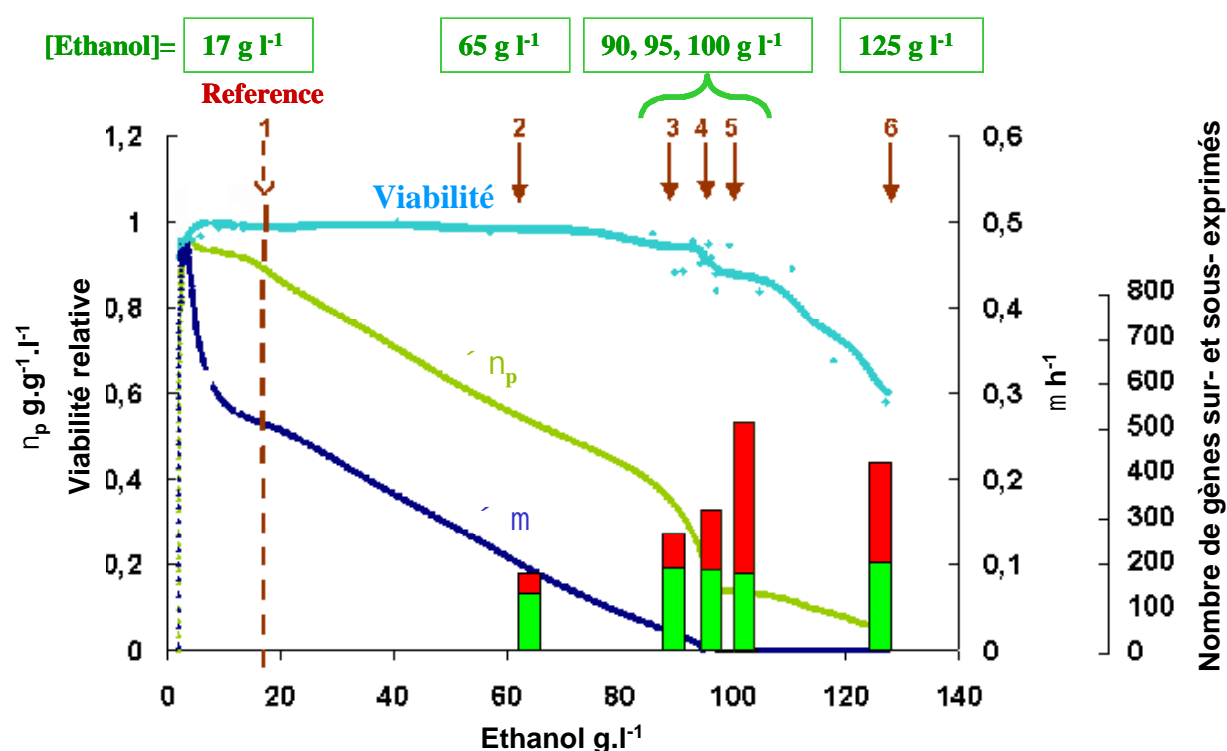


Figure 39 : Courbes : évolution du taux de croissance  $\mu$  (—), de la vitesse spécifique de production d'éthanol  $v_p$  (—) et de la viabilité mesurée (— - —) au bleu de méthylène en fonction de la concentration en éthanol. Histogrammes : représentation du nombre de gènes sur-exprimés (■) et du nombre de gènes sous-exprimés (■), en fonction de la concentration en éthanol.

La séparation de la fermentation en deux phases se retrouve nettement avec l'application d'une classification hiérarchique par le logiciel Cluster sur les temps de fermentation (cf. figure 40). Les échantillons 3 et 4, correspondant à la toute fin de la phase de croissance sont proches entre eux et plus proches de l'échantillon 2, milieu de phase de croissance, que des échantillons 5 et 6, même si 3,4 et 5 sont très proches temporellement et en concentration en éthanol. Les échantillons 5 et 6 sont donc eux plus caractéristiques de la phase de découplage. Ces résultats confirment bien l'importance des perturbations transcriptomiques et donc probablement physiologiques qui se produisent après l'arrêt de croissance.

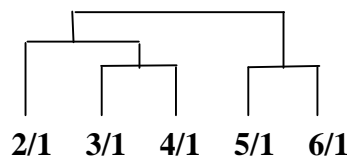


Figure 40 : Dendrogramme du cluster hiérarchique sur les prélèvements de la fermentation (prélèvements 2, 3, 4, 5 et 6 par rapport à la référence 1, cf. figures 37 et 38) effectué avec l'ensemble des ratios d'expression.

Le clustering hiérarchique sur les ratios d'expression n'a pas permis de mettre en évidence de familles de gènes co-régulés. Une analyse plus fine par un clustering de type SOM (Self Organizing Maps), nous a permis de distinguer uniquement deux profils (cf. figure 41).

Le premier profil regroupe les gènes sous-exprimés ayant le même comportement. Il suit le ralentissement puis l'arrêt du taux de croissance. Ceci s'explique car nous comparons des cellules en ralentissement puis arrêt de croissance, avec des cellules en pleine croissance (échantillon de référence).

Le deuxième profil est caractéristique des gènes sur-exprimés, qui le sont essentiellement après l'arrêt de la croissance (condition 5/1).

La très grande majorité des gènes a un profil d'expression correspondant au profil n°1 ou au profil n°2. Cette distinction correspond à la séparation entre gènes sur-exprimés et gènes sous-exprimés. Il existe cependant quelques exceptions au profil atypique qui pourront être étudiées individuellement.



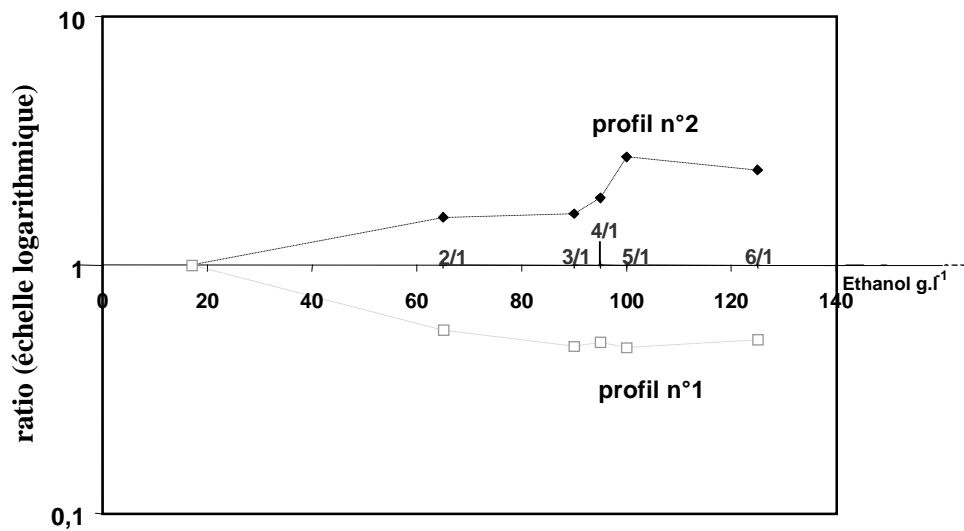


Figure 41 : Profil n°1 et n°2 des changements globaux d'expression en fonction de la concentration en éthanol par clustering de type SOM.

Les résultats des classifications par clustering ne sont pas surprenants car nous étudions ici une cinétique dans des conditions bien contrôlées où les concentrations en substrat, en biomasse et en produits évoluent mais sans changement brusque.

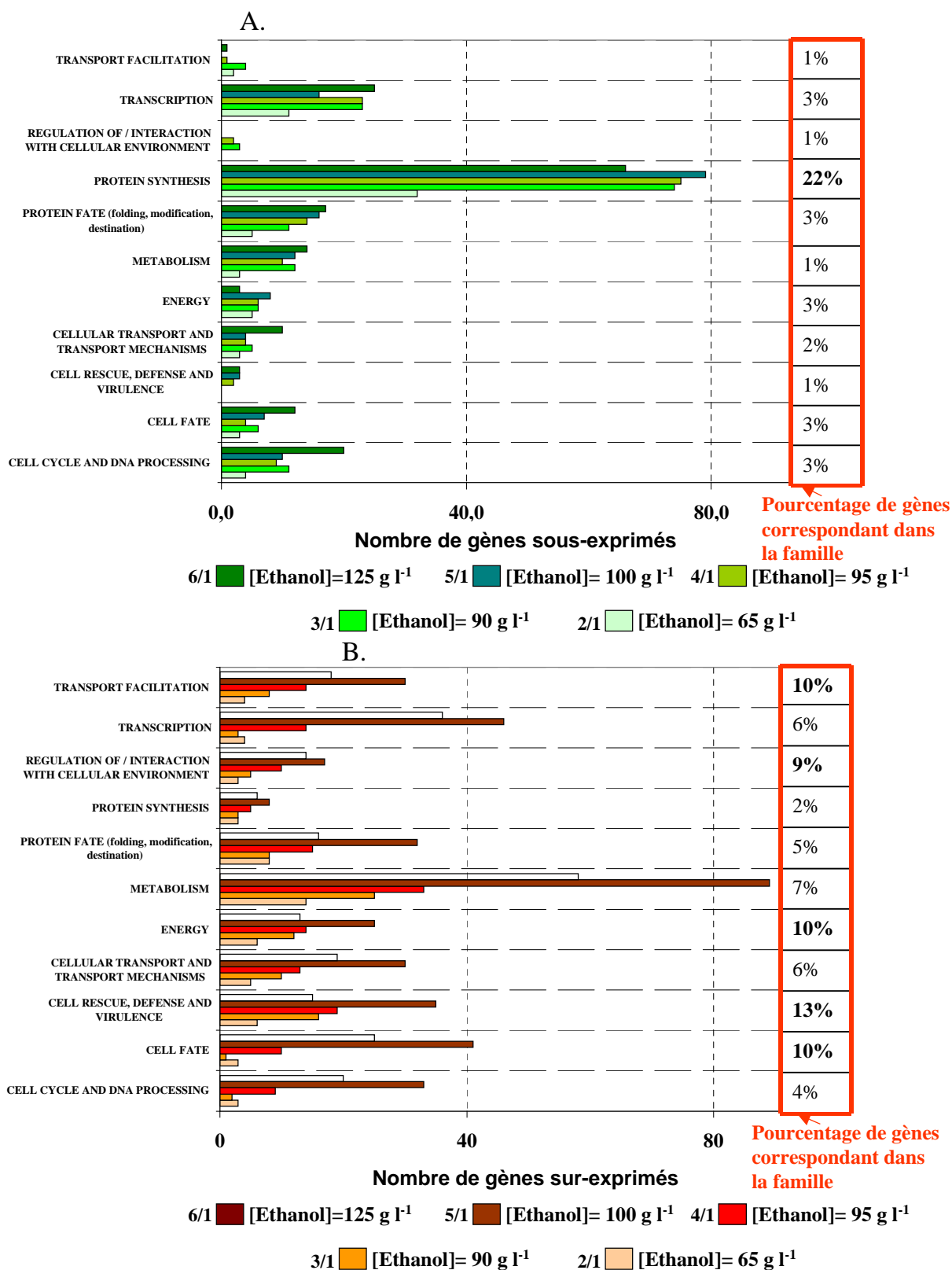
Pour l'échantillon 6, la diminution du nombre de gènes différentiellement sur-exprimés (cf. tableau 29) ainsi que de leur intensité (cf. figure 41) pourrait s'expliquer par la faible viabilité à ce prélèvement (seulement 60%). Nous ne connaissons pas l'état des ARN messagers dans les cellules non viables. Le mélange de cellules viables et non viables peut donc perturber les résultats expérimentaux.

## **II.2. Approfondissement des tendances métaboliques et localisation cellulaire des produits des gènes sur-exprimés et sous-exprimés**

### **II.2.i. Familles fonctionnelles intervenant dans l'adaptation à l'éthanol**

Afin de mieux décrypter les données transcriptomiques, nous avons donc décidé d'explorer les catégories fonctionnelles, définies par la classification MIPS, dans lesquelles sont impliqués les gènes sur-exprimés et sous-exprimés (cf. figure 39 et tableau 29).

La figure 42 présente le nombre de gènes, différentiellement exprimés de manière significative et ayant des ratios de sur- ou sous-expression supérieurs à 1,8, répartis dans les différentes catégories fonctionnelles (base MIPS), en fonction des concentrations en éthanol dans le réacteur. Pour compléter cette analyse, nous avons estimé les familles qui sont statistiquement enrichies grâce au logiciel FUNSPEC (Robinson *et al.* 2002). Ce logiciel permet de confronter une liste de gènes aux bases MIPS et Gene Ontology. Le logiciel renvoie une probabilité associée à chaque famille pour que le nombre de gènes soumis et associés à cette famille puisse être dû au hasard. Plus cette probabilité est faible, moins il y a de chance que la famille apparaisse comme enrichie par le fait du hasard. Le seuil de la probabilité est en général fixé au-dessous de 0,01. En entrée du logiciel FUNSPEC, j'ai décidé de mettre les gènes qui sont différentiellement exprimés aux stades 2,3,4 et/ou 5. L'échantillon 6 n'est pas exploité car, au vu des résultats des profils cinétiques (cf. figure 41) nous supposons que la présence de 40% de cellules non viables dans l'échantillon introduit un biais dans les résultats.



La figure 42 permet de se rendre compte du déséquilibre entre les gènes sur-exprimés et les gènes sous-exprimés.

Pour les gènes sous-exprimés, une famille est essentiellement impliquée : la synthèse protéique. 22% des gènes de cette famille sont sous-exprimés en fin de croissance (échantillon 4, 95 g.l<sup>-1</sup> d'éthanol). FUNSPEC identifie aussi cette famille avec une probabilité inférieure à  $10^{-14}$  (cf. tableau 30). Ce sont essentiellement des gènes impliqués dans la synthèse des ribosomes.

Pour les gènes sur-exprimés, beaucoup de familles de la base MIPS semblent affectées lors de l'adaptation de la levure à l'accumulation d'éthanol et surtout au moment où la croissance s'arrête. FUNSPEC permet de mettre en évidence les plus pertinentes d'entre elles (cf. tableau 31). Il y a un enrichissement significatif des familles de stress et de défense cellulaire, du métabolisme carboné, de l'énergétique cellulaire, des transports et de la différenciation cellulaire. Parmi les sous-familles du métabolisme carboné, les métabolismes pariétaux et des réserves énergétiques (tréhalose et glycogène) sont mis en évidence. La confrontation à la base de Gene Ontology permet de mettre en évidence d'autres fonctions moléculaires (cf. tableau 32), notamment celles concernant le transport d'hexoses et le métabolisme lipidique.

Tableau 30 : Analyse statistique par le logiciel FUNSPEC des catégories fonctionnelles de la base MIPS enrichies pour les ORFs sous-exprimés dans les échantillons 2, 3, 4, et/ou 5.

Catégories	P value <sup>a</sup>	Gènes sous-exprimés dans les échantillons 2, 3, 4 ou 5
Ribosome biogenesis And protein synthesis	$< 10^{-14}$	RPL30 RPS26A RPS25A RPL26B RPS23A RPL24B RPS20 RPS27B RPS4B RPS24B RPL16A RPL40A RPL39 RPS4A RPL40B RPS0B RPS31 RPL37A RPS28B RPL38 RPL31B RPL6B RPS17A RPS18B RPS1B RPS16A RPS10B RPL20A MRPL33 RPL9B RPS7B RPL42A RPS3 RPS15 RPL3 RPS7A RPL33B RPS12 RPL5 RPS23B

<sup>a</sup> La Pvalue permet d'estimer la probabilité que le set de gènes de la famille donnée ressorte par effet du hasard.

Tableau 31 : Analyse statistique par le logiciel FUNSPEC des catégories fonctionnelles de la base MIPS enrichies pour les ORFs sur-exprimés dans les échantillons 2, 3, 4, et/ou 5.

Catégories	P value <sup>a</sup>	Gènes sur-exprimés dans les échantillons 3, 4 ou 5
<b>METABOLISM</b>	$2,1.10^{-10}$	YAL061W YAT1 OSH1 BNA4 NTH2 TIP1 BAP2 FAT2 HIS7 SUL1 GLK1 PHO87 GIT1 AAD3 FAD1 HXT15 GAL3 NRG1 ADR1 MTH1 HXT7 HXT6 HXT3 SSN2 SNF1 LPP1 GLC3 GLC7 ADK2 FAU1 HSP12 GAT1 AAD6 PHO4 HXK1 SCS3 GSC2 ATF2 TDH3 ENO1 MAL11 LAG1 OPI1 PUT2 IRE1 HXT4 GRE3 ENO2 PIG2 AYR1 IMP2' MET28 TDH1 RPE1 KRE9 HXT8 HXT9 TES1 BAT2 GFA1 YBT1 ASP3-1 ASP3-2 DPH5 AAC1 ISF1 PGM2 FSH2 GPI12 GLC8 IDH1 RNH35 RHO2 NPR1 MET2 ERG24 WSC2 PFK27 GAC1 HIS3 SNF2 PHO85 ISU1 ICL2 ROX1
C-compound and carbohydrate metabolism	$3,8.10^{-10}$	YAL061W NTH2 GLK1 AAD3 HXT15 GAL3 NRG1 ADR1 MTH1 HXT7 HXT6 HXT3 SSN2 SNF1 GLC3 GLC7 HSP12 AAD6 HXK1 GSC2 ATF2 TDH3 ENO1 MAL11 HXT4 GRE3 ENO2 PIG2 AYR1 IMP2' TDH1 RPE1 KRE9 HXT8 HXT9 GFA1 PGM2 GLC8 IDH1 RHO2 WSC2 PFK27 GAC1 SNF2 PHO85 ICL2
C-compound, carbohydrate transport	$4,2.10^{-05}$	GLK1 HXT15 HXT7 HXT6 HXT3 MAL11 HXT4 HXT8 HXT9
C-compound and carbohydrate utilization	$6,9.10^{-05}$	YAL061W NTH2 GLK1 AAD3 GLC3 HSP12 AAD6 HXK1 GSC2 ATF2 TDH3 ENO1 GRE3 ENO2 PIG2 AYR1 TDH1 RPE1 KRE9 GFA1 PGM2 IDH1 WSC2 PFK27 ICL2
metabolism of energy reserves (glycogen, trehalose)	0,0001	NTH2 GLC3 GLC7 PIG2 PGM2 GAC1 PHO85 HSP82
regulation of C-compound and carbohydrate utilization	0,0004	GAL3 NRG1 ADR1 MTH1 SSN2 SNF1 GLC7 IMP2' GLC8 RHO2 PFK27 GAC1 SNF2 PHO85
cell wall	0,004	TIP1 TIR1 PIR3 DAN2 ASP3-1 ASP3-2
<b>CELL RESCUE, DEFENSE AND VIRULENCE</b>	$2,2.10^{-09}$	SSA1 SSA3 TIP1 HSP26 SSE2 GRX1 HSP30 SED1 HSP78 SNF1 ECM10 CYC7 TIR1 SSA4 HSP12 HSF1 MPT5 TPO2 CUP1-1 CUP1-2 IRE1 GRE3 TIR3 GPX1 PIR3 HSP104 AHP1 HSP60 DDR48 YCK2 YGP1 CRS5 MKK1 SRL1 HSP82
stress response	$8,8.10^{-11}$	SSA1 SSA3 TIP1 HSP26 SSE2 GRX1 HSP30 SED1 HSP78 SNF1 ECM10 CYC7 TIR1 SSA4 HSP12 HSF1 MPT5 IRE1 GRE3 TIR3 PIR3 HSP104 AHP1 HSP60 DDR48 YCK2 YGP1 MKK1 HSP82
<b>ENERGY</b>	$4,4.10^{-06}$	YAL061W NTH2 GLK1 AAD3 NDE2 COX20 GLC3 CYC7 GLC7 AAD6 HXK1 TDH3 ENO1 ENO2 PIG2 COX5B TDH1 RPE1 QCR8 PGM2 IDH1 COX5A GAC1 PHO85 HSP82 FDH2 ICL2
metabolism of energy reserves	0,0001	NTH2 GLC3 GLC7 PIG2 PGM2 GAC1 PHO85 HSP82
<b>REGULATION OF / INTERACTION WITH CELLULAR ENVIRONMENT</b>	0,0005	FUS3 SCO1 SUL1 PCA1 HSP30 PHO87 STE5 HSP12 FET5 MPT5 GIC1 KHA1 FAR1 UTR1 CNB1 AHP1 TFS1 CRS5 TPK2
<b>TRANSPORT FACILITATION</b>	0,001	YAT1 BAP2 SUL1 PCA1 PHO87 GIT1 HXT15 DNF2 HXT7 HXT6 HXT3 KRE30 FET5 MEP1 TPO2 MAL11 HXT4 KHA1 HXT8 HXT9 YBT1 AAC1 DNF3 MAS6 AQY1
cellular import	$5,6.10^{-05}$	BAP2 SUL1 GLK1 HXT7 HXT6 HXT3 FET5 MEP1 HXT4 PAN1 HXT8 HXT9 YCK2 SCD6
C-compound, carbohydrate transport	$4,2.10^{-05}$	GLK1 HXT15 HXT7 HXT6 HXT3 MAL11 HXT4 HXT8 HXT9
<b>CELL FATE</b>	0,005	FUS3 SEF1 HMRA1 SIR2 STE5 SPR6 GLC7 ADK2 MPT5 GSC2 LAG1 RIM4 GIC1 AYR1 AXL2 PAN1 FAR1 KRE9 IME1 PHD1 GFA1 CNB1 NAP1 RHO2 YCK2 BNI1 MKK1 SNF2 HSP82
fungal cell differentiation	0,004	FUS3 SEF1 HMRA1 SIR2 STE5 SPR6 GLC7 MPT5 GSC2 RIM4 GIC1 AYR1 AXL2 PAN1 FAR1 KRE9 IME1 PHD1 GFA1 CNB1 NAP1 RHO2 YCK2 BNI1 MKK1 SNF2 HSP82
cell differentiation	0,004	FUS3 SEF1 HMRA1 SIR2 STE5 SPR6 GLC7 MPT5 GSC2 RIM4 GIC1 AYR1 AXL2 PAN1 FAR1 KRE9 IME1 PHD1 GFA1 CNB1 NAP1 RHO2 YCK2 BNI1 MKK1 SNF2 HSP82

<sup>a</sup> La Pvalue permet d'estimer la probabilité que le set de gènes de la famille donnée ressorte par effet du hasard.

Tableau 32 : Analyse statistique par le logiciel FUNSPEC des fonctions moléculaires de Gene Ontology enrichies pour les ORFs sur-exprimés dans les échantillons 2, 3, 4, et/ou 5.

Catégories	P value <sup>a</sup>	Gènes sur-exprimés dans les échantillons 2, 3, 4 ou 5
heat shock protein [GO:0003773]	$<1.10^{-14}$	SSA1 SSA3 HSP26 SSE2 HSP30 HSP42 HSP78 ECM10 SSA4 HSP12 HSP104 HSP60 HSP82
chaperone [GO:0003754]	$4,9.10^{-08}$	SSA1 SSA3 HSP26 SSE2 HSP30 HSP42 COX20 HSP78 ECM10 SSA4 HSP12 HSP104 HSP60 SCJ1 HSP82
hexose transporter [GO:0015149]	$6,4.10^{-06}$	HXT15 HXT7 HXT6 HXT3 HXT4 HXT8 HXT9
transporter [GO:0005215]	$5,6.10^{-05}$	BAP2 FAT2 SUL1 PCA1 PHO87 GIT1 NDE2 HXT15 DNF2 HXT7 HXT6 HXT3 CYC7 KRE30 FET5 MEP1 MAL11 LAG1 SMF2 HXT4 COX5B KHA1 QCR8 HXT8 HXT9 YBT1 AAC1 DNF3 COX5A MAS6 HSP82 AQY1
ion transporter [GO:0015075]	0,0001	SUL1 PCA1 DNF2 FET5 MEP1 SMF2 COX5B KHA1 QCR8 YBT1 DNF3 COX5A HSP82
oxidoreductase [GO:0016491]	0,0005	BNA4 GRX1 AAD3 NDE2 FET5 AAD6 TDH3 PUT2 GRE3 COX5B AYR1 TDH1 QCR8 GPX1 AHP1 IDH1 COX5A NAR1 ERG24 FDH2
structural constituent of cell wall [GO:0005199]	0,0007	TIP1 SED1 TIR1 PIR3
carrier [GO:0005386]	0,0009	PCA1 PHO87 DNF2 CYC7 KRE30 FET5 MAL11 SMF2 COX5B KHA1 QCR8 YBT1 AAC1 DNF3 COX5A HSP82
phosphotransferase, alcohol group as acceptor [GO:0016773]	0,001	FUS3 GLK1 KIN82 CDC7 FMN1 SNF1 ADK2 HXK1 PCL5 IRE1 UTR1 PRR1 YCK2 PFK27 MKK1 PHO85 TPK2
lipid binding [GO:0008289]	0,001	OSH1 GIT1 DNF2 TFS1 DNF3
phospholipid binding [GO:0005543]	0,002	OSH1 GIT1 DNF2 DNF3
lipid transporter [GO:0005319]	0,002	FAT2 GIT1 DNF2 DNF3

<sup>a</sup> La Pvalue permet d'estimer la probabilité que le set de gènes de la famille donnée ressorte par effet du hasard.

## II.2.ii. Localisation cellulaire des produits des gènes sur-exprimés pendant la fermentation alcoolique

La base MIPS permet aussi de connaître la localisation du produit du gène au sein de la cellule, lorsque celle-ci est connue. Sur l'ensemble des gènes du génome de la levure, la localisation de leur produit est connue pour 2469 d'entre eux. Par exemple, 32,7 % se situent dans le noyau, 22,4% dans le cytoplasme et 5,9% dans la membrane plasmique (cf. tableau 33).

A partir des données obtenues sur la fermentation étudiée, il semble y avoir un enrichissement des gènes dont le produit se situe dans la membrane plasmique. En effet, ceux-ci représentent environ 5,9 % du génome mais entre 10 et 18% des gènes sur-exprimés dans nos conditions. Cette hypothèse est confirmée par l'application du logiciel FUNSPEC. En effet, le logiciel donne un enrichissement de la localisation dans la membrane plasmique avec une probabilité de  $4,4.10^{-7}$ , ainsi que dans une plus faible mesure dans la membrane interne de la

mitochondrie et dans la paroi (cf. tableau 34).

Tableau 33 : Localisation cellulaire des produits des gènes soit pour l'ensemble du génome, soit pour les gènes sur-exprimés aux différents temps de fermentation (échantillons 2, 3, 4, et/ou 5). La répartition dans les différentes localisations est indiquée par le nombre de gènes, dont le produit est localisé dans la classe, exprimé en pourcentage du nombre de gènes dont le produit est localisable.

Classes	Génome	Fermentation				
		temps 2/1	temps 3/1	temps 4/1	temps 5/1	temps 6/1
PAROI	1,5		3,0	3,3	3,6	2,3
CENTROSOME	1,3			1,7	1,5	1,1
CYTOPLASME	22,4	23,8	39,4	23,3	20,4	20,5
CYTOSQUELETTE	4,4	9,5	3,0	3,3	3,6	5,7
RETICULUM ENDOPLASMIQUE	6,4	9,5	6,1	6,7	3,6	3,4
ENDOSOME	0,5					
EXTRACELLULAIRE	0,8		3,0	3,3	1,5	1,1
APPAREIL DE GOLGI	3,3	4,8	3,0	1,7	2,2	1,1
TRANSPORT INTRACELLULAIRE	1,7		3,0	1,7	1,5	1,1
MITOCHONDRIE	14,8	23,8	9,1	10,0	14,6	13,6
NOYAU	32,7	14,3	6,1	26,7	30,7	34,1
PEROXISOME	1,6		3,0	3,3	2,2	3,4
<b>MEMBRANE PLASMIQUE</b>	<b>5,9</b>	<b>9,5</b>	<b>18,2</b>	<b>13,3</b>	<b>13,1</b>	<b>11,4</b>
VESICULE /LYSOSOME	2,4	4,8	3,0	1,7	1,5	1,1
Nombre de gènes dont le produit est localisable	2469	21	33	60	137	87

Tableau 34 : Analyse statistique par le logiciel FUNSPEC de la localisation cellulaire fournie par la base MIPS enrichies pour les ORFs sur-exprimés dans les échantillons 2, 3, 4, et/ou 5.

Catégories	P value <sup>a</sup>	Gènes sur-exprimés dans les échantillons 3, 4 ou 5
Plasmic membrane	$4,4.10^{-7}$	BAP2 SUL1 HSP30 GIT1 HXT15 SED1 HXT7 HXT6 HXT3 FET5 GSC2 MEP1 APM2 HXT4 AXL2 HXT8 HXT9 YPS1 YPS3 YCK2 TPK2
Inner membrane of mitochondria	$1,5.10^{-3}$	YAT1 SCO1 NDE2 COX20 PET122 ADK2 SMF2 COX5B QCR8 AAC1 COX5A MAS6
Cell wall	$3,1.10^{-3}$	TIP1 SED1 TIR1 PIR3 ASP3-1 ASP3-2

<sup>a</sup> La Pvalue permet d'estimer la probabilité que le set de gènes de la famille donnée ressorte par effet du hasard.

### **II.3. Etude détaillée des données d'expression pertinentes pour la compréhension de l'adaptation de la levure à sa production d'éthanol**

#### **II.3.i. Synthèse protéique réprimée et ralentissement de la croissance**

Au vu des résultats présentés ci-dessus, l'adaptation des levures au cours de cette fermentation s'accompagne d'une répression d'un pool de gènes impliqués pour la majorité dans la transcription (sous-unités des ARN polymérases I, II et III) et la synthèse de protéines (synthèse des ribosomes et des ARN<sub>t</sub> et initiation de la traduction). La régulation négative de ces gènes est corrélée avec le ralentissement de la croissance. En effet, pour l'échantillon de référence (temps 1) le taux de croissance est de 0,26 h<sup>-1</sup>, alors qu'il n'est déjà plus que de 0,09 h<sup>-1</sup> pour l'échantillon 2 et qu'il est nul pour les autres échantillons 3, 4 et 5 (qui correspondent à l'arrêt de la croissance et l'entrée en phase de découplage croissance-production).

La répression de gènes appartenant à ces catégories fonctionnelles est aussi observée après un choc éthanol (Alexandre *et al.* 2001), mais aussi en réponse à des changements environnementaux (choc, limitation...) (Causton *et al.* 2001; Gasch et Werner-Washburne 2002). Cependant, les mécanismes par lesquels la présence d'éthanol induit une répression des gènes de synthèse protéique sont encore inconnus.

Contrairement aux gènes réprimés, les gènes induits sont impliqués dans une large variété de processus cellulaires. La cellule réagit d'une part pour se protéger et d'autre part adapte sa physiologie à son nouvel environnement.

#### **II.3.ii. La réponse aux stress et changements environnementaux : deux facteurs de transcription impliqués (cf. annexe 1)**

Un système de réponse au stress et de défense cellulaire semble se mettre en place dès l'échantillon 2 (qui correspond à une concentration en éthanol de 65 g.l<sup>-1</sup>). La réponse s'intensifie avec l'accumulation d'éthanol dans le milieu. Nous retrouvons des gènes mis en évidence lors de la réponse commune à plusieurs stress et changements environnementaux (Environment Stress Response ESR (Gasch *et al.* 2000), Response to Environmental Change REC (Causton *et al.* 2001)), notamment le gène du facteur de transcription Hsf1p. Récemment, Hahn *et al.* (2004) ont identifié un certain nombre de cibles des HSF (heat shock factor) par immuno-précipitation de la chromatine combinée aux puces à ADN. Nous avons



remarqué que 30% de cette liste de gènes se retrouvent sur-exprimés dans nos conditions (cf. figure 43 et annexe 1). Les HSF sont des facteurs de transcription qui activent l'expression de gènes en réponse à un stress. Ces gènes activés contiennent dans leur promoteur des motifs de réponse au stress thermique (Heat Shock Element HSE). Ils jouent différents rôles biologiques : le repliement des protéines, la prévention des agrégations de protéines, l'adressage et la dégradation des protéines, l'activation et la maturation des protéines de la transduction du signal et des facteurs de transcription (cf. figure 43).

A partir de la base YPD (Garrels 1996), un certain nombre de gènes régulés par les facteurs de transcription Msn2p/Msn4p, facteurs « généraux » du stress, a aussi été identifié (cf. figure 43). Les gènes activés par Msn2/4p contiennent dans leur promoteur des éléments de réponse au stress (STRE) (l'annexe 1 renvoie les gènes de la famille « cell rescue defense and virulence » significativement sur-exprimés lors de la fermentation et s'ils font partie de la réponse commune au stress (Causton *et al.* 2001) et/ou de la réponse à un choc éthanol (Alexandre *et al.* 1994a))

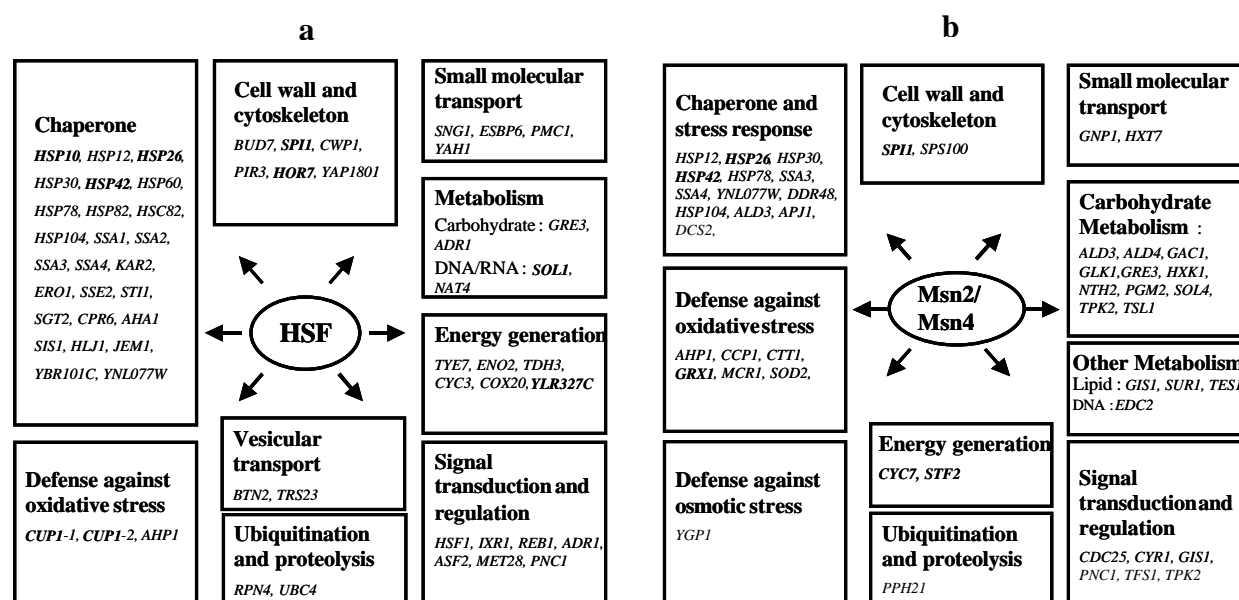


Figure 43 : Gènes cibles des facteurs de transcription (a) (Heat Shock Factor) HSF et (b) Msn2/Msn4 induits dans nos conditions. Les cibles HSF et Msn2/Msn4p sont classées selon leur fonction connue ou hypothétique en se basant sur la base YPD.

Les cibles des HSF et de Msn2/Msn4p sont impliquées dans beaucoup de processus cellulaires. La plupart des gènes sur-exprimés dans nos conditions codent pour des protéines aux fonctions de chaperonnes, de maintenance de la paroi cellulaire et du cytosquelette, de la

défense contre des stress oxydatifs et osmotiques. Certains gènes sont aussi liés au métabolisme carboné, lipidique et à celui des acides nucléiques, aux systèmes de transports, de transduction du signal, de génération d'énergie, d'ubiquitination et de protéolyse.

Certaines chaperonnes sont déjà connues pour avoir un lien avec la résistance à la présence d'éthanol : Hsp12p, Hsp14p, et Hsp104p (Piper *et al.* 1994;Piper 1995). Hsp30p est connue pour être impliquée dans la régulation du pH intracellulaire, notamment dans l'activation de l'ATPase membranaire en présence d'éthanol (Piper *et al.* 1997).

De manière surprenante, peu de gènes sont impliqués dans la réponse à des stress osmotiques (*SIP18*, *HOR7*) mais beaucoup plus de gènes codent pour des protéines qui jouent souvent un rôle dans des phénomènes de détoxification ou de réponse aux stress oxydatifs : metallothionine (Cup1-1p, Cup1-2p), alkyl hydroperoxyde reductase (Ahp1p), cytochrome-c peroxydase (Ccp1p), glutathione peroxydase (Grx1p, Gpx1p), catalase (Ctt1p), NADH-cytochrome b5 reductase (Mcr1p) et manganese superoxyde dismutase (Sod2p), thioredoxine (Trr2p), Crs5p, Ubc4p.

Plus des deux tiers de ces gènes cibles de HSF ou Msn2/4p sont sur-exprimés dans d'autres analyses de génomique fonctionnelle globale : par exemple, dans le cadre d'un choc éthanol (Alexandre *et al.* 2001), dans la réponse commune aux changements environnementaux (Causton *et al.* 2001) ou lors d'une fermentation vinicole (Rossignol *et al.* 2003).

### **II.3.iii. Métabolisme lié aux alcools (cf. tableau 35)**

Pour la levure *Saccharomyces cerevisiae*, il existe cinq isoformes de l'alcool déshydrogénase. *ADH1* et *ADH2* codent pour des enzymes qui, en théorie, peuvent à la fois conduire la réaction dans le sens de la réduction et de l'oxydation. De part ses propriétés cinétiques, Adh1p qui est une protéine cytoplasmique, catalyse spécifiquement la réaction dans le sens de la production d'éthanol à partir d'acétaldéhyde. En effet, la constante d'affinité pour l'éthanol est de l'ordre de 17 à 20 mM pour adh1p, contre 600 à 800  $\mu$ M pour Adh2p (Thomson *et al.* 2005). Adh2p a donc plus d'affinité pour l'éthanol et donc favoriserait la réaction dans le sens de l'oxydation.

Nos données transcriptomiques indiqueraient que *ADH2* est déréprimé à partir de l'arrêt de la croissance, alors qu'il est normalement réprimé en présence de glucose (Walther et Schuller 2001). D'autres alcool-déshydrogénases sont aussi induites au fur et à mesure de l'avancement de la fermentation. Il s'agit principalement de gènes codant pour des aryl-alcool

déshydrogénases : *AAD3*, *AAD6*, *AAD10* et *AAD15* (cf. tableau 35). *FUN50*, dont le produit présente des similarités avec une alcool/sorbitol déshydrogénase, et *ATF2*, codant pour une alcool O-acétyltransférase, présentent aussi le même profil. Ces changements d'expression suggèrent une production d'autres alcools plus complexes que l'éthanol.

#### **II.3.iv. Métabolisme des réserves : tréhalose et glycogène (cf. tableau 36)**

Le profil d'accumulation des réserves de cette fermentation se compose de deux phases (cf. figure 44a) : une phase d'accumulation et une phase de stagnation, voire reconsommation pour le glycogène. Au niveau de l'expression des gènes de cette voie (cf. figure 44b), pendant la phase d'accumulation, *PGM2* est fortement sur-exprimé. Il code pour l'enzyme réversible d'entrée dans la voie de synthèse de réserves. Il y a aussi sur-expression de *GLC3* dont le produit participe à la synthèse du glycogène. Au moment où la croissance s'arrête, les gènes codant pour le complexe Glc7p-Gac1p-Pig2p-Gip2p, qui participe à la régulation positive de la synthèse du glycogène, commencent à être sur-exprimés. Mais paradoxalement, *PHO85* qui code pour un régulateur négatif de la synthèse de glycogène est aussi sur-exprimé en même temps qu'une diminution de l'expression de *PGM2* (cf. tableau 36).

Pour le tréhalose, il y a activation de *NTH2*, codant pour une tréhalase, ce qui pourrait expliquer l'arrêt d'accumulation du tréhalose à l'échantillon 5 (cf. figure 44a). Cependant, la principale tréhalase qui permet la mobilisation du tréhalose est Nth1p (François et Parrou 2001) dont l'expression du gène ne semble pas varier. Toutefois, de récents travaux au sein du laboratoire indiquent que Nth2p serait active dans des conditions particulières de stress, ce qui serait confirmé par nos résultats (Jules M., Parrou, J.L., François J., non publié)

Le glycogène et le tréhalose sont connus pour s'accumuler dans les conditions de stress et de limitation nutritionnelle (Parrou *et al.* 1997; Parrou *et al.* 1999). L'activation de gènes de synthèse et de dégradation des réserves a déjà été mis en évidence dans des phénomènes de stress ou de changements environnementaux (exemple : choc éthanol (Alexandre *et al.* 2001), stress salin (Blomberg 2000)). Ceci peut permettre une régulation plus fine du contenu intracellulaire en réserves. Certains auteurs font l'hypothèse de l'existence de cycle futile consommateur d'ATP, pour avoir une meilleure régulation du pool énergétique (Blomberg 2000). En effet, la formation de tréhalose à partir de glucose et sa redégradation en unités glucose consomment deux ATP et un UTP. Dans nos conditions, la présence d'un cycle futile n'est pas évidente car *NTH2* est le seul gène de dégradation des réserves qui est sur-exprimé

et seuls les gènes de synthèse du glycogène sont activés. Des informations ont pu être perdues à cause des erreurs expérimentales lors du traitement statistique. Nous ne pouvons donc pas conclure sur ce point. De plus, les prélèvements 3, 4 et 5 correspondent toujours à la phase d'accumulation de réserves (cf. figure 44). Seul le prélèvement 6 correspond à la phase de stagnation voire reconsommation. Or, nous avons déjà émis l'hypothèse que la présence de 40% de cellules non viables à ce moment-là pourrait entraîner un biais dans les résultats.

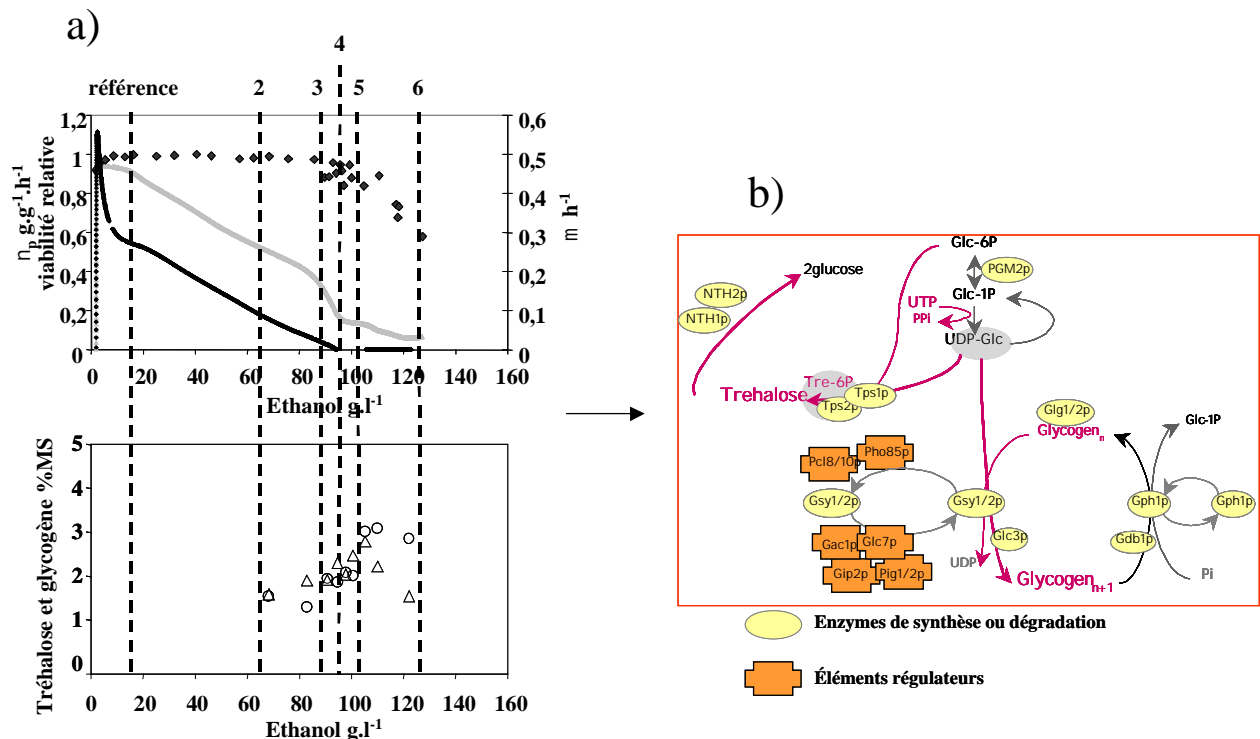


Figure 44 : a) Taux de croissance  $\mu$  (—), vitesse spécifique de production d'éthanol  $v_p$  (---), viabilité cellulaire mesurée au bleu de méthylène ( $\odot$ ) et accumulation des réserves intracellulaires en tréhalose ( $\triangle$ ) et en glycogène ( $\circ$ ) exprimées en pourcentage de la masse sèche (% MS) en fonction de la concentration en éthanol dans le milieu pour la fermentation n°1. Référence (1), 2, 3, 4, 5 et 6 correspondent aux échantillons d'ARN pour l'analyse des profils d'expression des gènes. b) schéma de synthèse et dégradation des réserves.

### II.3.v. Métabolisme pariétal (cf. tableau 37)

Dix-sept gènes sur-exprimés sont classés dans la famille du métabolisme pariétal. Parmi eux, *GSC2* code pour une protéine qui permet l'élongation des  $\beta$ -1,3-glucanes et *KRE9* est impliqué dans la synthèse des  $\beta$ -1,6-glucanes. De plus, *GFA1* et *GNA1* qui codent pour les enzymes qui catalysent les premières étapes de synthèse du N-acétyl-glucosamine, précurseur de la chitine, sont induits surtout en fin de fermentation (cf. tableau 37).

Mais *MUC1*, qui est un gène de dégradation des glucanes codant pour une  $\alpha$ -1,4-glucosidase, est aussi sur-exprimé pendant la phase de découplage. Les gènes de plusieurs mannoprotéines sont aussi induits : Tip1p est une estérase, qui se fixe à la structure polysaccharidique de la paroi par son ancre GPI ; Srp1p est une exo- $\beta$ -1,3-glucanase alors que Pir1p est une protéine pariétale qui formerait un complexe avec Srp1p et Dan2p qui est très similaire à la famille Srt1p/Tir1p.

Ces données semblent indiquer que la structure pariétale de la levure subit des modifications au cours du processus de production intensive d'éthanol. Nous vérifierons ce point plus tard en analysant les composants pariétaux (cf. partie VI).

### II.3.vi. Métabolisme lipidique (cf. tableau 38)

Plusieurs gènes sur-exprimés sont des gènes de dégradation lipidique : *TIP1* et *TES1* codent pour des estérases ; le produit de *YAT1* contribue à la dégradation des acides gras dans le peroxyosome.

Parallèlement, un certain nombre de gènes de synthèse des phospholipides et des stérols semblent sous-exprimés très tôt dans la fermentation mais pas de manière importante donc il n'apparaissent pas significatifs dans nos résultats. Seuls *ERG24* est sur-exprimé.

*MCT1* qui code pour une des premières étapes de synthèse des acides gras est fortement sous-exprimé.

L'induction de *OPI1*, régulateur négatif de la synthèse de phosphatidyl-inositol, semble aller à contresens de la sur-expression de *SCS3*, impliqué dans la synthèse de phosphatidyl-inositol.

De plus, deux gènes sur-exprimés sont impliqués dans la synthèse d'acides gras à longue chaîne (*FAA1* et *FAT2*).

Les gènes de lipides sur-exprimés sont plutôt liés aux métabolismes des sphingolipides et du phosphatidyl-inositol : *DLP1*, *GPII2*, *INP52*, *GIT1*, *LCB1*, *LPP1* et *SUR1*. Le produit de *SUR1* est impliqué dans la mannosylation des sphingolipides (IPC) et celui de *GPII2* intervient dans la synthèse des ancres GPI.

Se retrouvent aussi sur-exprimés des gènes impliqués dans les transports lipidiques : *DNF2*, *DNF3*, *FAT2*, *GIT1*...

Les données transcriptomiques suggèrent donc aussi des remaniements au sein de la composition cellulaire en lipides au cours de l'adaptation des levures à leur propre production intensive d'éthanol. Ce point sera exploré par l'analyse de la composition lipidique dans la partie VI.

### **II.3.vii. Respiration et balance redox (cf. tableau 39)**

Les éléments de la chaîne respiratoire qui sont sur-exprimés interviennent surtout au niveau des sous-unités du cytochrome c et de la cytochrome c-oxydase : *CYC7*, *COX5B*, *COX5A*, *QCR8*. Ils correspondent à la fin de la chaîne respiratoire.

De plus, *NDH2*, codant pour une NADH déshydrogénase mitochondriale qui catalyse l'oxydation du NADH cytosolique, est fortement induit (plus de 4 fois). L'activation de la chaîne respiratoire et de *NDH2* pourrait entraîner une augmentation de la consommation de NADH par ces voies, ce qui serait défavorable à la production d'éthanol. L'activité respiratoire semblerait s'intensifier en fin de fermentation. Plus de NADH serait donc réoxydé par cette voie au détriment de la production d'éthanol.

### **II.3.viii. Homéostasie et transport cellulaire**

Un grand nombre de gènes sur-exprimés sont liés au maintien de l'homéostasie et au transport cellulaire. Environ une trentaine de gènes liés au transport sont activés. Sont concernés les transports d'anions (*SUL1*, 2, *PHO87*, *MEP1*, *SCO1*...), de cations (*FET5*, *SFM2*, *PMC1*...), d'hexoses (*HXT3*, 4, 6, 7, 8, 9), de lipides (cf. II.3.vi) et la famille des transporteurs ABC (*MDL2*, *KRE30*).

L'éthanol est connu pour inhiber les transporteurs membranaires (Cardoso et Leao 1992; Ferreras *et al.* 1989; Garcia et Kotyk 1988; Leao et van Uden 1982). La surexpression des gènes codant pour ces transporteurs est peut-être un effet compensatoire des levures afin de s'adapter à la production intensive d'éthanol.

Tableau 35 : Niveau d'expression des gènes liés au métabolisme des alcools et différentiellement sur-exprimés à au moins un moment dans nos conditions.

ORF	Gène	Fonction	Echantillon				
			2	3	4	5	6
YJR155W	<i>AAD10</i>	strong similarity to aryl-alcohol dehydrogenase			+	+	+
YOL165C	<i>AAD15</i>	putative aryl alcohol dehydrogenase			+	+	+
YCR107W	<i>AAD3</i>	strong similarity aryl-alcohol reductases of <i>P. chrysosporium</i>	+	+	+	+	+
YFL056C	<i>AAD6</i>	strong similarity to aryl-alcohol dehydrogenases	+	+	+	++	+
YOL086C	<i>ADH1</i>	alcohol dehydrogenase I				+	
YMR303C	<i>ADH2</i>	alcohol dehydrogenase II			+	+	+
YAL061W	<i>FUN50</i>	similarity to alcohol/sorbitol dehydrogenase	+		+	+	+

+ : induit 1,5 à 2,5 fois; ++ : induit 2,5 to 3,5 fois; +++ : > 3,5 fois; +++++, > 7 fois; ++++++ : > 20 fois ; Pvalue<0,05

Tableau 36 : Niveau d'expression des gènes liés au métabolisme des sucres de réserve et différentiellement sur-exprimés à au moins un moment dans nos conditions.

ORF	Gène	Fonction	Echantillon				
			2	3	4	5	6
YOR178C	<i>GAC1</i>	ser/thr phosphoprotein phosphatase 1, regulatory chain		+	+	++	+
YER054C	<i>GIP2</i>	GLC7P-interacting protein				+	
YER133W	<i>GLC7</i>	ser/thr phosphoprotein phosphatase 1, catalytic chain			+	+	+
YLR258W	<i>GSY2</i>	UDP-glucose--starch glucosyltransferase, isoform 2				+	
YPL240C	<i>HSP82</i>	heat shock protein			+	+	+
YBR001C	<i>NTH2</i>	alpha,alpha-trehalase			+	+	+
YMR105C	<i>PGM2</i>	phosphoglucomutase, major isoform	+	++		+	+
YPL031C	<i>PHO85</i>	cyclin-dependent protein kinase			+	+	+
YIL045W	<i>PIG2</i>	Protein Interacting with GSY2P			+	+	+
YEL011W	<i>GLC3</i>	1,4-glucan branching enzyme (glycogen branching enzyme)		+			

+ : induit 1,5 à 2,5 fois; ++ : induit 2,5 to 3,5 fois; +++ : > 3,5 fois; +++++, > 7 fois; ++++++ : > 20 fois.

Tableau 37 : Niveau d'expression des gènes liés au métabolisme pariétal et différentiellement sur-exprimés à au moins un moment dans nos conditions.

ORF name	Gène	Fonction	Echantillon				
			2	3	4	5	6
YIL154C	<i>(IMP2)</i>	sugar utilization regulatory protein	+	+	+	++	++
YLR155C	<i>ASP3A</i>	L-asparaginase II	+		+	++	+
YLR157C	<i>ASP3B</i>	L-asparaginase II		+		+	+
YLR158C	<i>ASP3C</i>	L-asparaginase II	+		+	+	+
YLR160C	<i>ASP3D</i>	L-asparaginase II		+		+	+
YLR037C	<i>DAN2</i>	strong similarity to members of the SRP1P/TIP1P family				+	+
YEL030W	<i>ECM10</i>	heat shock protein of HSP70 family	+	+	+	+++	++
YKL104C	<i>GFA1</i>	glucosamine--fructose-6-phosphate transaminase			+	+	+
YFL017C	<i>GNA1</i>	essential acetyltransferase				+	
YGR032W	<i>GSC2</i>	1,3-beta-D-glucan synthase subunit		+		+	+
YJL174W	<i>KRE9</i>	cell wall synthesis protein	+		+	+	+
YIR019C	<i>MUC1</i>	extracellular alpha-1,4-glucan glucosidase			+	+	+
YKL163W	<i>PIR3</i>	member of the PIR1P/Pir2p/PIR3P family	+	+	+	+	+
YER150W	<i>SPI1</i>	Stationary Phase Induced	+	+	++	+++	+++
YOR190W	<i>SPR1</i>	exo-1,3-beta-glucanase precursor				+	+
YBR067C	<i>TIP1</i>	esterase			+	+	+
YER011W	<i>TIR1</i>	cold-shock induced protein of the TIR1P,TIP1P family	+		+	+	+

+ : induit 1,5 à 2,5 fois; ++ : induit 2,5 to 3,5 fois; +++ : > 3,5 fois; +++++, > 7 fois; ++++++ : > 20 fois.



Tableau 38 : Niveau d'expression des gènes liés au métabolisme des lipides et différentiellement sur-exprimés à au moins un moment dans nos conditions.

ORF	Gène	Fonction	Echantillon				
			2	3	4	5	6
YDR093W	<i>DNF2</i>	similarity to P.falciparum ATPase 2	+	+		+	+
YMR162C	<i>DNF3</i>	similarity to ATPases	+	+	++	++	++
YDR294C	<i>DPL1</i>	dihydrosphingosine phosphate lyase				+	+
YNL280C	<i>ERG24</i>	C-14 sterol reductase				+	
YOR317W	<i>FAA1</i>	long-chain-fatty-acid--CoA ligase				+	+
YBR222C	<i>FAT2</i>	AMP-binding protein, peroxisomal	+	+		+	+
YCR098C	<i>GIT1</i>	glycerophosphoinositol transporter	+		+	+	+
YMR281W	<i>GPI12</i>	N-acetylglucosaminyl phosphatidylinositol deacetylase				+	+
YFL014W	<i>HSP12</i>	heat shock protein	+	+	+	+	+
YNL106C	<i>INP52</i>	phosphatidylinositol phosphate phosphatase				+	+
YHR079C	<i>IRE1</i>	protein kinase	+++			+	+
YER019W	<i>ISC1</i>	weak similarity to human and mouse neutral sphingomyelinase				+	+
YHL003C	<i>LAG1</i>	longevity-assurance protein	+		+	++	+
YMR296C	<i>LCB1</i>	serine C-palmitoyltransferase subunit				+	+
YDR503C	<i>LPP1</i>	lipid phosphate phosphatase				+	+
YOR370C	<i>MRS6</i>	geranylgeranyltransferase regulatory subunit				+	+
YHL020C	<i>OPI1</i>	negative regulator of phospholipid biosynthesis pathway	+		+	+	+
YAR044W	<i>OSH1</i>	similarity to human oxysterol binding protein (OSBP)				+	+
YHR001W	<i>OSH7</i>	similarity to KES1P				++	+
YGL126W	<i>SCS3</i>	inositol phospholipid synthesis protein	+	+	+	+	+
YPL057C	<i>SUR1</i>	required for mannosylation of sphingolipids				+	+
YJR019C	<i>TES1</i>	thioesterase, peroxisomal		+	+	+	++
YLR178C	<i>TFS1</i>	CDC25-dependent nutrient- and ammonia-response cell-cycle regulator	+	+	+	+	
YBR067C	<i>TIP1</i>	esterase			+	+	+
YAR035W	<i>YAT1</i>	carnitine acetyltransferase, mitochondrial				+	
YLL048C	<i>YBT1</i>	yeast bile transporter	++	+	++	+++	+++
YJL068C		strong similarity to human esterase D	+		+	++	+
YOR221C	<i>MCT1</i>	malonyl-CoA:ACP transferase	--	--	---	---	---

+ : induit 1,5 à 2,5 fois; ++ : induit 2,5 to 3,5 fois; +++ : &gt; 3,5 fois; +++++, &gt; 7 fois; ++++++ : &gt; 20 fois

Tableau 39 : Niveau d'expression des gènes liés à la chaîne respiratoire et à la balance redox et différentiellement sur-exprimés à au moins un moment dans nos conditions.

ORF	Gène	Fonction	Echantillon				
			2	3	4	5	6
YEL039C	<i>CYC7</i>	cytochrome-c isoform 2	+	+++	++	+++	+++
YDL085W	<i>NDH2</i>	mitochondrial NADH dehydrogenase that catalyzes the oxidation of cytosolic NADH	+	+	+	+++	+++
YPL271W	<i>ATP15</i>	F1F0-ATPase complex, F1 epsilon subunit				++	+
YNL052W	<i>COX5A</i>	cytochrome-c oxidase chain V.A precursor			+	+	+
YIL111W	<i>COX5B</i>	cytochrome-c oxidase chain Vb				+	+
YML120C	<i>NDI1</i>	NADH-ubiquinone-6 oxidoreductase	+			+	+

+ : induit 1,5 à 2,5 fois; ++ : induit 2,5 to 3,5 fois; +++ : > 3,5 fois; +++++, > 7 fois; ++++++ : > 20 fois

### III. Conclusion de la partie V

Cette étude constitue une approche transcriptomique préliminaire à la compréhension du phénomène d'inhibition par l'éthanol en condition de production intensive. L'avancement de la réaction a été suivi par rapport à un échantillon de référence pris en début de fermentation. Ainsi nous disposons d'une vue d'ensemble de l'induction ou de la répression des gènes au cours de la production intensive d'éthanol dans nos conditions.

En accord avec les données cinétiques, la fermentation se sépare en deux phases. Pendant la phase de croissance, peu de gènes sont induits, mais beaucoup de gènes sont réprimés très rapidement. Le ralentissement de la croissance entraîne une diminution des besoins en synthèse protéique. Ainsi, la part énergétique économisée pourrait servir à d'autres processus. Pendant la phase de découplage, les gènes sur-exprimés sont de plus en plus nombreux et le nombre de gènes réprimés n'évolue plus.

Une réponse générale au stress se met très nettement en place. Cette réponse s'intensifie, surtout après le découplage. Le nombre de gènes induits appartenant à la fonction de réponse au stress et de détoxification augmente, ainsi que leur intensité d'expression, avec l'état d'avancement du procédé vers de fortes teneurs en éthanol dans le milieu. La réponse semble essentiellement dépendante de deux types de facteurs de transcription : Mns2/4p et les Hsf. Cette réponse est caractéristique de cellules soumises à des changements environnementaux (Environment Stress Response ESR (Gasch *et al.* 2000), Response to Environmental Change REC (Causton *et al.* 2001)). Elle englobe plusieurs familles fonctionnelles dont notamment les gènes codant pour les enzymes participant au métabolisme des réserves intracellulaires, à la balance redox, à la régulation de l'homéostasie cellulaire et à l'intégrité des structures cellulaires, en plus des traditionnels gènes dit « de stress » (Gasch et Werner-Washburne 2002). La réponse au stress commence à se mettre en place pendant la phase de croissance. Mais les autres changements importants semblent arriver tard dans la fermentation, alors que la croissance est arrêtée et que la viabilité commence à chuter...

De plus, notre étude suggère des remaniements pariétaux et lipidiques. A cela s'ajoute l'induction de gènes codant des protéines de transport de molécules de plus en plus variées (hexose, lipidique, ionique...) et un enrichissement en gènes dont le produit sera localisé

surtout dans la membrane plasmique mais aussi dans la membrane interne des mitochondries. Ces remarques confirment l'importance de la membrane plasmique en tant que cible de l'éthanol, comme le décrit la littérature (cf. partie I : étude bibliographique). L'éthanol est connu pour modifier les propriétés de la membrane et notamment perturber l'activité de l'ATPase membranaire (Alexandre *et al.* 1996). *HSP30*, qui code un régulateur supposé de l'H<sup>+</sup>-ATPase membranaire (Piper *et al.* 1997), est activé comme lors d'un choc éthanol (Alexandre *et al.* 2001) et aussi dans nos conditions. L'éthanol inhibe certains transporteurs (Leao et van Uden 1982; Thomas et Rose 1979). Lors de l'ajout d'éthanol dans le milieu (Alexandre *et al.* 2001; Fujita *et al.* 2004) ou d'autres solvants hydrophiles (Fujita *et al.* 2004; Zhang *et al.* 2003), certains gènes de la famille des transports sont aussi induits. L'induction de nombreux gènes codant pour des transporteurs viserait à contrebalancer l'inhibition de ces derniers par l'éthanol. L'homéostasie de la cellule est perturbée et la cellule réagit en modifiant ses enveloppes cellulaires. La paroi aussi semble jouer un rôle dans la tolérance à l'éthanol dans nos conditions, comme suggéré par la littérature (Ogawa *et al.* 2000; Takahashi *et al.* 2001).

Nous retrouvons quelques similarités avec d'autres expériences réalisées en présence d'éthanol ou d'autres solvants hydrophiles (Alexandre *et al.* 2001; Fujita *et al.* 2004; Zhang *et al.* 2003). 38 gènes seulement sont sur-exprimés en commun avec un choc éthanol (Alexandre *et al.* 2001). Il s'agit de gènes liés au stress, au métabolisme des réserves et au transport. Ethanol et DMSO sont tous les deux des solvants hydrophiles, ils sont donc susceptibles d'avoir des effets similaires sur les cellules, notamment au niveau de la membrane et de la paroi. En effet, la réponse de la levure à sa propre production d'éthanol peut présenter des similitudes avec la réponse d'une levure pendant une croissance en présence d'un autre solvant organique, le DMSO (Zhang *et al.* 2003). Seulement 19 gènes sont sur-exprimés dans les deux cas mais nous retrouvons les mêmes familles fonctionnelles : la réponse à un changement environnemental, la synthèse et l'utilisation des lipides, le métabolisme des acides aminés, la synthèse pariétale, les transports. Finalement, peu de gènes sont induits en commun entre ces expériences et la notre, ce qui souligne bien l'originalité de ce travail et l'intérêt de travailler en condition de production d'éthanol pour étudier l'adaptation des levures à l'éthanol.

Enfin, dans notre cas, comme attendu, il n'y a pas de mise en évidence d'une quelconque limitation nutritionnelle. Par exemple, les gènes contrôlés par le système TOR ne sont pas

affectés contrairement à ce qui est observé lors des fermentations vinicoles qui subissent une limitation en azote (Rossignol *et al.* 2003). Il est difficile de comparer nos résultats avec d'autres fermentations alcooliques car les conditions étudiées par ailleurs peuvent être très différentes. Dans la plupart des cas, il est très difficile d'isoler l'effet de la présence d'éthanol car de nombreux phénomènes se superposent, comme dans les conditions œnologiques (Marks *et al.* 2003;Perez-Ortin *et al.* 2002;Rossignol *et al.* 2003), brassicoles (James *et al.* 2003;Olesen *et al.* 2002) ou sur milieu complexe (Shima *et al.* 2005) : carence nutritionnelle, propriétés physico-chimiques variables, différence d'aération, .....



# **Partie VI :**

## **Analyse de la physiologie des levures au cours de deux fermentations conduisant à des différences significatives en titre éthanolique**





Afin de cerner les métabolismes « clés » d'une bonne adaptation des levures à des concentrations en éthanol supérieures à 120 g.l<sup>-1</sup>, j'ai choisi de comparer deux fermentations de performances différentes. Ces deux fermentations sont présentées dans la partie IV. Il s'agit des fermentations 3 et 4. La première a atteint un titre final de 141 g.l<sup>-1</sup> et la seconde de 120 g.l<sup>-1</sup> (cf. figure 45). Cette différence de performance repose sur une plus grande phase de découplage. Cette phase est d'autant plus longue que la viabilité cellulaire se maintient. La perte de viabilité semble être associée à une perte d'activité métabolique, ce que nous allons confirmer par le suivi des concentrations intracellulaires de certains métabolites glycolytiques et énergétiques. L'évolution du contenu intracellulaire en sucres de réserves (tréhalose et glycogène) va aussi nous donner des indications sur l'état physiologique des levures aux différents stades des deux fermentations. De plus, l'éthanol est connu pour induire des perturbations au niveau de la membrane affectant le gradient transmembranaire de protons (Leao et van Uden 1984) pour des concentrations en éthanol inférieure à 10 % v/v (soit environ 80 g.l<sup>-1</sup>). Que se passe-t-il dans nos gammes de concentrations encore plus élevées ? Les enveloppes cellulaires semblent être les premières cibles de l'action de l'éthanol (cf. partie I « étude bibliographique »), comme le confirment les résultats transcriptomiques de la partie V. C'est pourquoi, nous avons déterminé les contenus lipidiques et en sucres pariétaux des cellules.

## **I. Impact de la production d'éthanol sur l'activité glycolytique et l'accumulation de sucres de réserves des levures**

Les deux fermentations 3 et 4 n'ont pas eu les mêmes comportements au niveau de la viabilité cellulaire (cf. figure 45). Lors de la fermentation 3 la viabilité s'est effondrée très rapidement après l'arrêt de la croissance, alors que pour la fermentation 4, elle s'est maintenue pendant plus de 10 h après l'arrêt de la croissance entraînant une meilleure production d'éthanol, qui se traduit par une augmentation de 17% du titre final en éthanol par rapport à la fermentation 3. La perte de viabilité mesurée semble être en fait une perte d'activité métabolique, ce que nous souhaitons confirmer par le suivi de métabolites glycolytiques (Glucose-6-P, Fructose-6-P et fructose-1-6-P) et énergétique (ATP, ADP, AMP).

### I.1. Evolution des métabolites glycolytiques et énergétiques intracellulaires

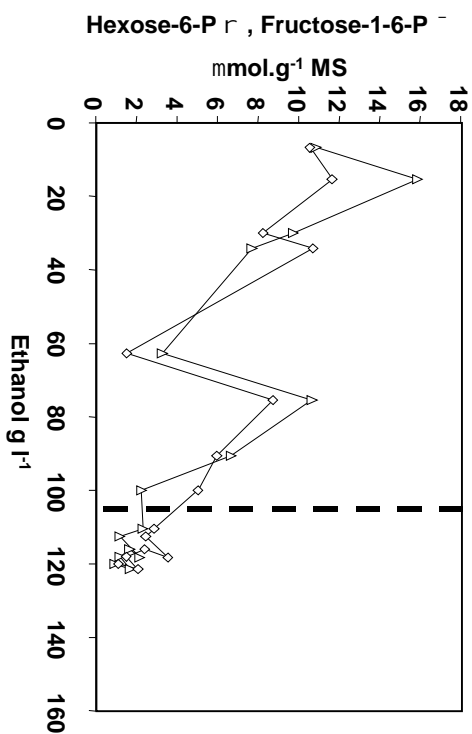
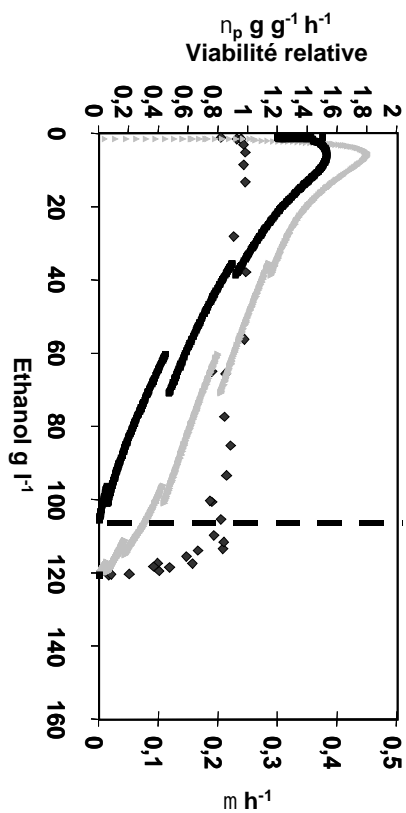
Les contenus en glucose-6-phosphate et fructose-6-phosphate sont en équilibre dans la cellule grâce à la phosphoglucoisomérase qui catalyse une réaction réversible. Le terme hexose-6-phosphate renverra donc à la somme du glucose-6-phosphate et du fructose-6-phosphate. Les contenus en sucres phosphorylés diminuent progressivement jusqu'à l'arrêt de la croissance (cf. figure 45). Cette baisse est en accord avec une diminution de l'activité glycolytique suivant le ralentissement de la croissance. Après l'arrêt de la croissance, le pool de métabolites glycolytiques est en faible quantité et varie peu.

Nous observons, en fin de croissance, un pulse d'hexose-6-phosphate après un ajout de glucose (cf. figure 45). Ce comportement est caractéristique de cellules ayant déjà un flux glycolytique fortement ralenti (François *et al.* 1984). Dans nos conditions, les importantes variations de glucose dans le milieu induisent d'importantes variations du pool de métabolites intracellulaires. Corréler ces variations au pulse de glucose n'est pas le propos ici.

Les contenus cellulaires en ATP, en ADP et en AMP sont liés par l'adénylate kinase:

$ATP + AMP \rightleftharpoons ADP + ADP$ . Donc, la somme des nucléotides adénosines ATP+ADP+AMP doit être constante s'il n'y a ni synthèse *de novo*, ni dégradation ou fuite cellulaire. La somme ATP+ADP+AMP reste sensiblement constante jusqu'à la perte de viabilité. Les pools énergétiques diminuent exactement en parallèle à la perte de viabilité des cellules au cours du processus de fermentation (cf. figure 46). Il y a donc disparition de ces réservoirs énergétiques au sein de la cellule. Ceci peut être dû soit à une dégradation intracellulaire, soit à une fuite de ces métabolites à l'extérieur de la cellule. Les teneurs intracellulaires en métabolites glycolytiques sont aussi faibles après l'arrêt de la croissance. Y a-t-il aussi dégradation ou fuite extracellulaire ?

## Fermentation 3



## Fermentation 4

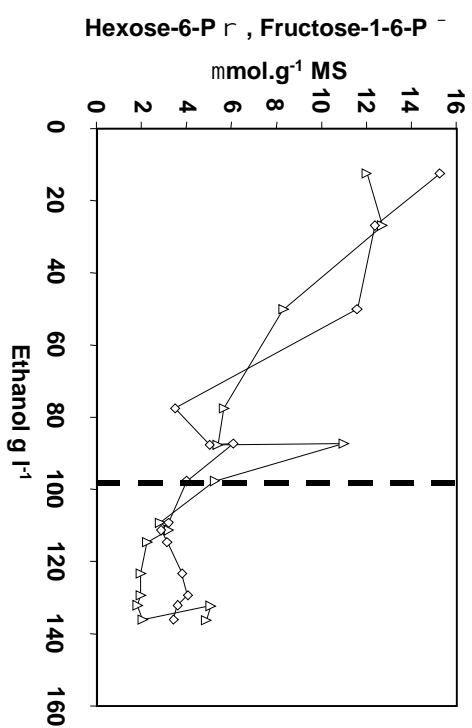
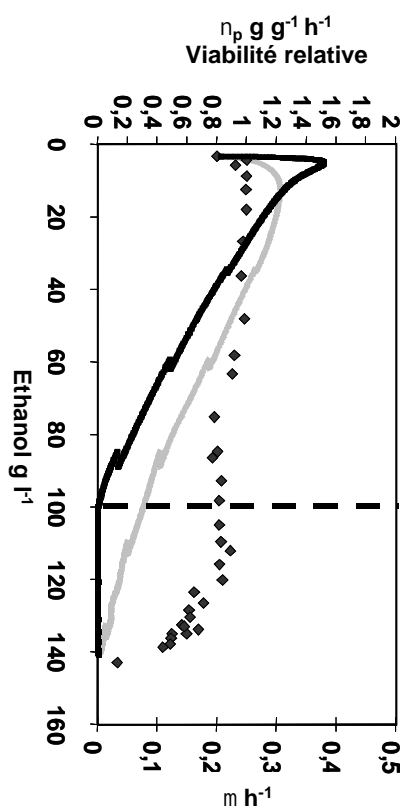


Figure 45 : Evolution, en fonction de la concentration en éthanol, du taux de croissance  $\mu$  (—), de la vitesse spécifique de production d'éthanol  $V_p$  (—), de la viabilité (—) ; des contenus intracellulaires rapportés à la masse sèche (% MS) de cellules en hexose (—) et en fructose-6-phosphate (—) et en fructose-1-6-phosphate (—) pour les fermentations 3 et 4. - - - : arrêt de la croissance séparant la phase de croissance de la phase de découplage



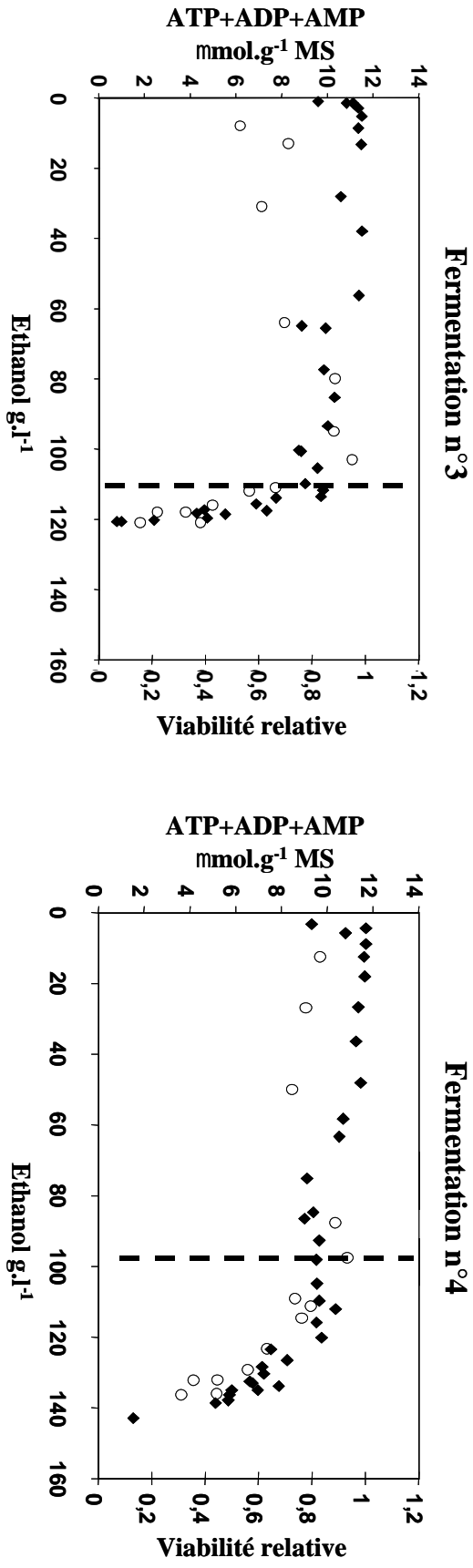


Figure 46 : Evolution de la viabilité (◇) et du contenu intracellulaire rapportés à la masse sèche (MS) de cellules du pool de nucléotides (ATP+ADP+AMP) (○) pendant les fermentations 3 et 4, en fonction de la concentration en éthanol. - - - : arrêt de la croissance séparant la phase de croissance de la phase de découplage.

## **I.2. Fuite extracellulaire de métabolites**

Afin de vérifier l'hypothèse de fuite des nucléotides hors de la cellule, nous avons mesuré les métabolites présents dans le surnageant de culture (cf. figure 47).

Les adénines nucléotides se retrouvent en effet dans le surnageant (cf. figure 47). Il y a majoritairement de l'AMP (50 à 90%), un peu d'ADP (10 à 50 %) et peu d'ATP (0 à 20%), contrairement au contenu intracellulaire (ATP : 40-60%). L'ATP qui se retrouve dans le milieu de culture est peut-être hydrolysé en ADP et AMP.

De plus, des sucres phosphorylés, tels que le glucose-6-phosphate (cf. figure 47), sont aussi présents dans le milieu. L'accumulation de métabolites intracellulaires dans le milieu corrèle avec la perte de viabilité mesurée par coloration au bleu de méthylène. Ces observations suggèrent, donc qu'en plus d'une perte d'activité métabolique, les cellules doivent subir des altérations membranaires qui perméabilisent la membrane et induisent la fuite du contenu cellulaire dans le milieu.

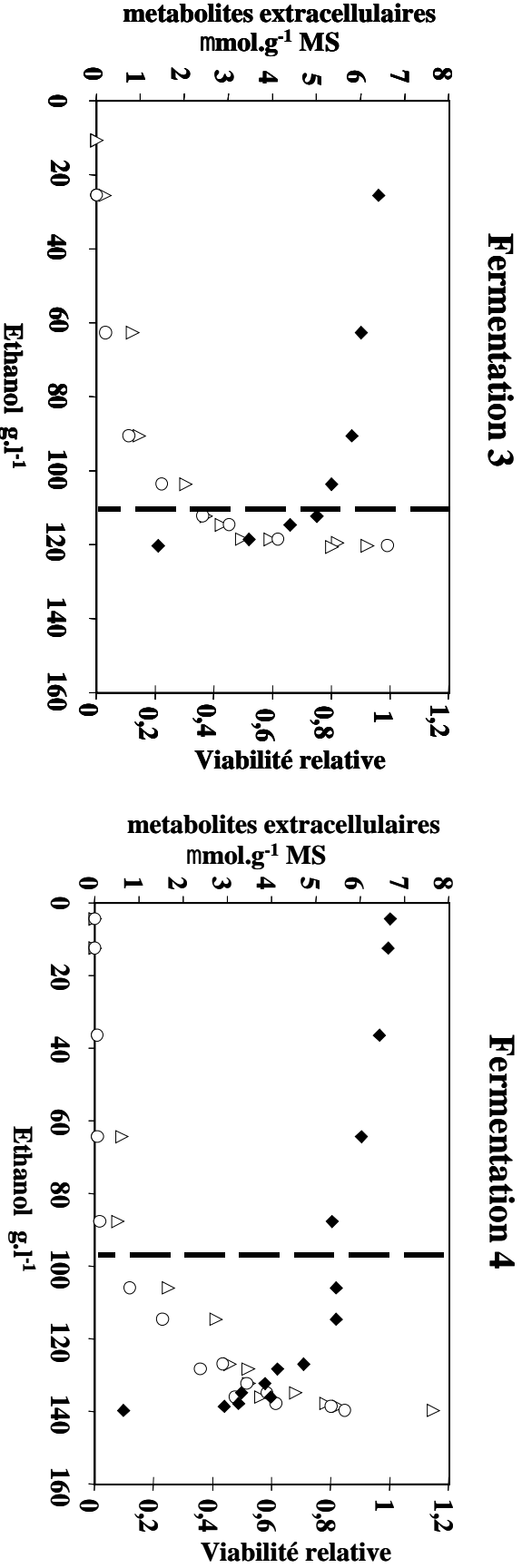


Figure 47 : Evolution, en fonction de la concentration en éthanol, de la viabilité cellulaire (  $\text{ATP}+\text{ADP}+\text{AMP}$  ) ( $\text{r}^{\text{TM}}$ ) et du glucose-6-phosphate ( $\text{r}$ ) extracellulaire pendant les fermentations 3 et 4. - - - - : arrêt de la croissance séparant la phase de croissance de la phase de découplage, de croissance de la phase de découplage.

### **I.3. Evolution du contenu intracellulaire en sucres de réserves : tréhalose et glycogène**

Nous nous intéressons au contenu intracellulaire en réserves de carbohydrates (tréhalose et glycogène) pour deux raisons. D'une part, des changements de la teneur en carbohydrates des levures ont été identifiés (cf. partie IV) pendant la fermentation alcoolique. Ils peuvent être dus à des modifications des sucres de réserves ou des sucres pariétaux. D'autre part, le tréhalose et le glycogène sont des marqueurs connus de l'adaptation physiologique lors de certains changements environnementaux : stress, carence nutritionnelle...(François et Parrou 2001).

Pendant la phase de croissance, peu de réserves s'accumulent (environ 1 à 2 % MS dans chaque cas). Ces accumulations sont relativement similaires dans chaque fermentation étudiée.

Par contre, il y a une deuxième phase d'accumulation des réserves pendant la phase de découplage et de perte de viabilité qui diffère selon les performances du procédé. Dans la fermentation 3, la performance finale en éthanol est de 120 g.l<sup>-1</sup>, pour une viabilité qui chute très rapidement après l'arrêt de la croissance, et il n'y a pratiquement pas d'accumulation ni de tréhalose, ni de glycogène. Les valeurs restent autour de 1 % MS pour chacune des réserves. Pour la fermentation 4, la plus performante (141 g.l<sup>-1</sup>), le glycogène s'accumule dès la fin de la phase de croissance, jusqu'à près de 8 % MS, avec une légère « reconsommation » pendant la perte de viabilité. Pour le tréhalose, il s'accumule surtout pendant la phase de découplage en corrélation avec la perte de viabilité, jusqu'à environ 4 % MS.

L'accumulation de carbohydrates s'accompagne d'une diminution des intermédiaires glycolytiques intracellulaires (par exemple, glucose-6-Phosphate, cf. figure 48) en accord avec l'annulation du taux de croissance et donc la forte réduction du flux glycolytique. De plus, l'accumulation de tréhalose est concomitante à une accumulation de tréhalose-6-Phosphate. L'UDP-glucose s'accumule transitoirement dans les deux cas mais sans influence apparente sur le déclenchement de l'accumulation de tréhalose ou de glycogène.



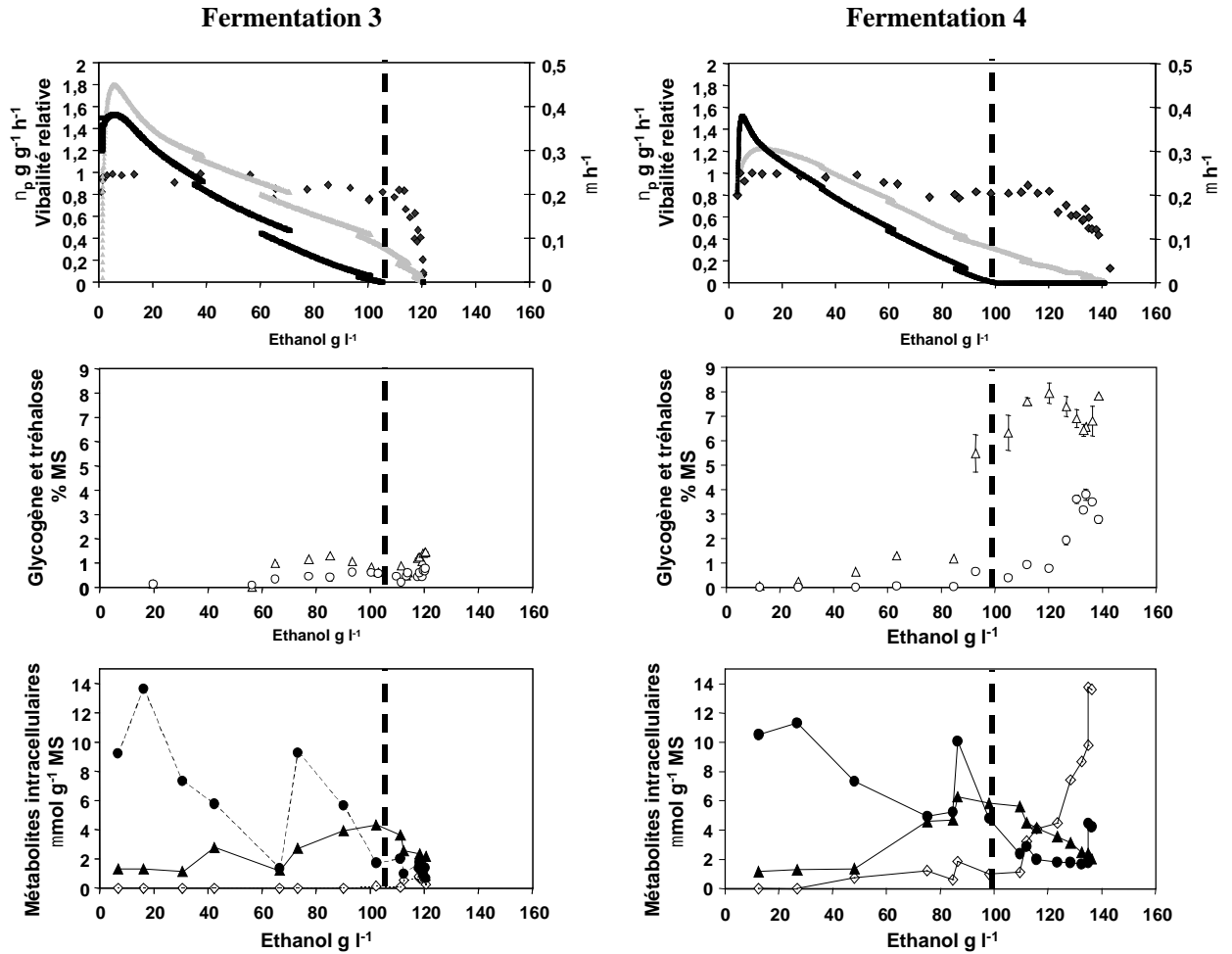


Figure 48 : Evolution, en fonction de la concentration en éthanol, du taux de croissance  $\mu$  (—), de la vitesse spécifique de production d'éthanol  $v_p$  (---), de la viabilité ( $\Delta$ ) ; des contenus intracellulaires rapportés à la masse sèche (% MS) de cellules en tréhalose ( $\nabla$ ) et glycogène ( $\rho$ ) ; et en tréhalose-6-P ( $\Delta$ ), glucose-6-P ( $\nabla$ ) et UDP-glucose ( $\rho$ ), pour les fermentations 3 et 4. - - - : arrêt de la croissance séparant la phase de croissance de la phase de découplage.



## **II. Impact de la production d'éthanol sur le contenu lipidique et les structures membranaires et pariétales**

La conduite en mode fed-batch implique forcément des changements de conditions environnementales pour les levures, notamment au niveau de l'accumulation de l'éthanol. Ces modifications induisent une adaptation des cellules à leur environnement et donc des modifications au niveau de la composition cellulaire. Nous avons vu précédemment que l'éthanol engendre des changements transcriptomiques au niveau de gènes dont le produit se situe dans les enveloppes cellulaires (membrane et paroi). A la vue des métabolites qui se retrouvent dans le milieu de culture, l'éthanol semble provoquer une perméabilisation importante des membranes dans nos conditions. De plus, d'après la littérature, la levure adapte sa composition lipidique à la présence d'éthanol, principalement sa composition en ergostérol, phospholipides et acides gras (cf. partie I : étude bibliographique). C'est pourquoi nous nous sommes intéressés au contenu lipidique et pariétal des cellules en condition de production intensive d'éthanol.

### **II.1. Impact de la production d'éthanol sur le contenu lipidique**

La méthode d'extraction des lipides totaux a été mise au point (cf. partie III) et des méthodes de quantification fiables ont été choisies. Plusieurs méthodes de quantification ont été utilisées pour analyser la composition lipidique des extraits. La gravimétrie permet d'obtenir la quantité de lipides totaux par pesée de l'extrait lipidique. La technique de chromatographie couche mince (CCM) permet de quantifier d'une part les lipides neutres (les acides gras libres ou estérifiés, les mono-, di- et triglycérides, les stérols libres et estérifiés) et d'autre part les phospholipides (Phosphatidyl-étanolamine PE, Phosphatidyl-inositol PI, Phosphatidyl-sérine PS, Phosphatidyl-glycérol PG, Phosphatidyl-choline PC, Cardiolipide CL, Acide Phosphatidique PA). Les dosages colorimétriques ne seront pas présentés ici car ils n'apportent pas d'informations supplémentaires par rapport à la CCM.

Comme discuté dans la partie bibliographique, chaque lipide a un rôle particulier au sein de la cellule. Nous allons, ici, nous intéresser à l'évolution de leurs teneurs cellulaires au cours des fermentations alcooliques et à la relier aux événements macrocinétiques qui se produisent lors du processus : accumulation d'éthanol, arrêt de la croissance et perte de viabilité.

Les phospholipides et les stérols sont connus pour leur influence en cas de présence d'éthanol (Chi et Arneborg 1999;Del Castillo Agudo 1992;Koukou *et al.* 1990;Swan et Watson

1998; Thomas *et al.* 1978). Leur contenu au cours des fermentations 3 et 4 sont résumés sur les figures 49 et 50. Cependant, ce ne sont pas les seuls lipides dont les teneurs cellulaires varient lors des fermentations. Il y a trois phases dans l'évolution du contenu lipidique des cellules : une phase de démarrage (les deux premiers échantillons pour la fermentation 3 et le premier pour la fermentation 4), une phase qui correspond à la phase de croissance cellulaire jusqu'à la perte de viabilité et une phase qui correspond à la perte de viabilité.

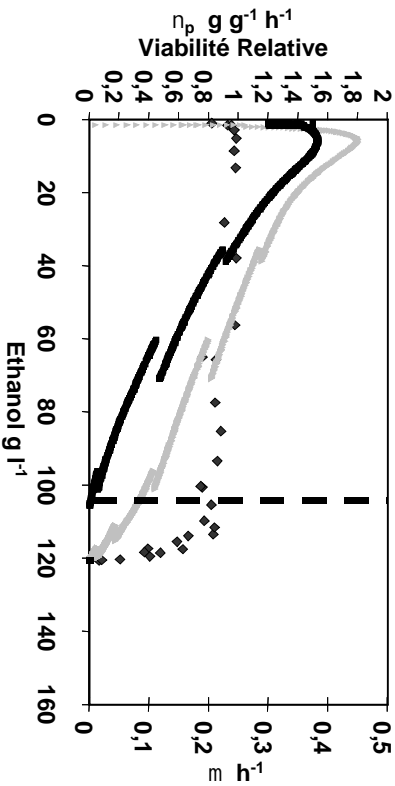
### **II.1.i. Evolution du contenu cellulaire en stérols et esters de stérols**

Dans nos échantillons, l'ergostérol et les esters de stérols représentent plus de 95% des stérols totaux. Le lanostérol est présent mais en faible quantité et peu de squalène a été détecté.

Pour les deux fermentations, les stérols évoluent suivant le même profil. Pendant la phase de croissance, la teneur en stérols totaux stagne autour de 0,7% pour la fermentation 3 et autour de 1% pour la fermentation 4. Elle augmente au moment de la perte de viabilité. Les proportions entre esters de stérol et ergostérol restent constantes pendant cette phase. Cette augmentation peut être due à une accumulation de stérols par les cellules viables pour lutter contre l'éthanol. Mais elle peut aussi s'expliquer par la fuite d'une partie du contenu intracellulaire qui diminue la masse sèche des cellules (cf. figure 49). Les teneurs des éléments restants, comme les stérols, s'en trouvent proportionnellement augmentées.

Par contre, dès le début de la fermentation, les compositions lipidiques des deux fermentations sont différentes. Il y a nettement plus de stérols dans la fermentation 4 que dans la fermentation 3 (1% de la masse sèche contre 0,7% de la masse sèche). Cette différence se situe surtout au niveau des réserves de stérols sous forme d'esters.

Fermentation 3



Fermentation 4

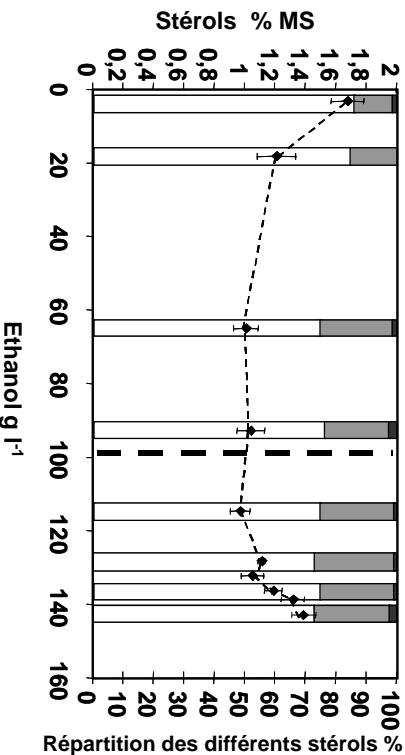
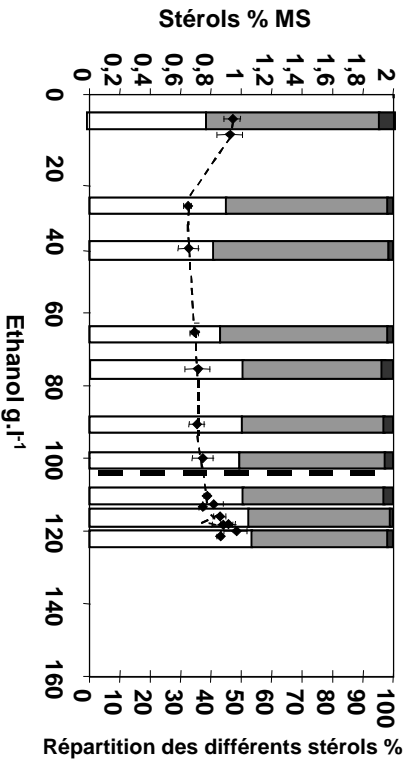
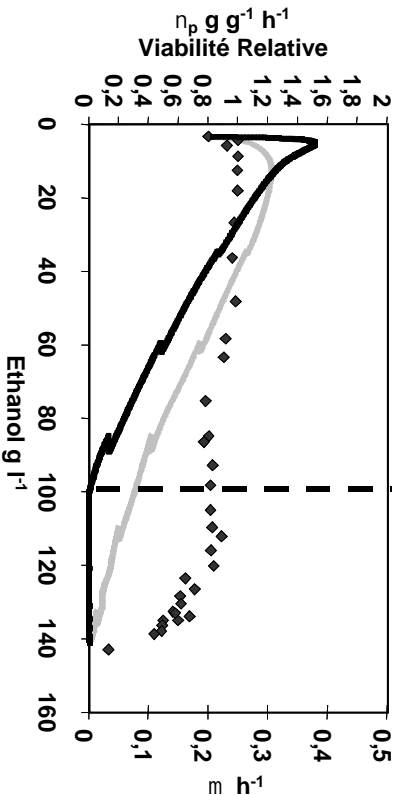


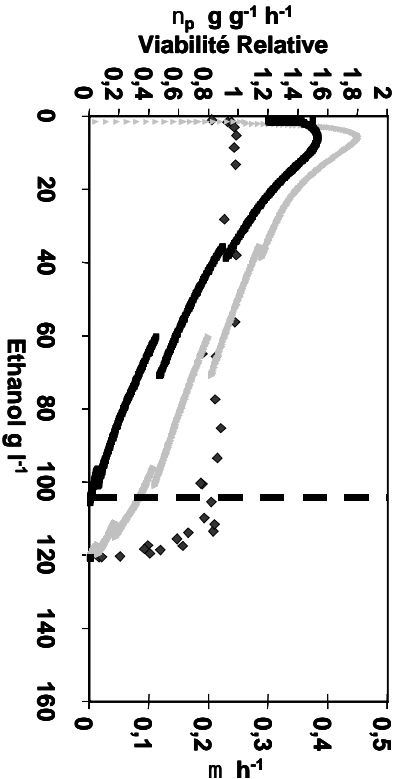
Figure 49 : Evolution, en fonction de la concentration en éthanol, du taux de croissance  $\mu$  (—), de la vitesse spécifique de production d'éthanol  $V_p$  (---), de la viabilité ( $\diamond$ ), du contenu intracellulaire en stérols totaux (somme des différents stérols séparés par CCM) ( $\diamond$ ), ramené à la masse sèche (% MS) de cellules, et de la répartition en lanos térol, ergostérol et esters de stérol dans les stérols totaux. ----- :arrêt de croissance séparant la phase de croissance de la phase de découplage.

## **II.1.ii. Evolution du contenu cellulaire en phospholipides (cf. figure 50)**

### ***a. Phospholipides totaux***

L'évolution des phospholipides totaux présente le même profil dans les deux fermentations étudiées. Le contenu en phospholipides diminue lentement pendant la phase de croissance, puis cette diminution s'accélère pendant la phase de découplage, surtout pendant la perte de viabilité (cf. figure 50).

Fermentation 3



Fermentation 4

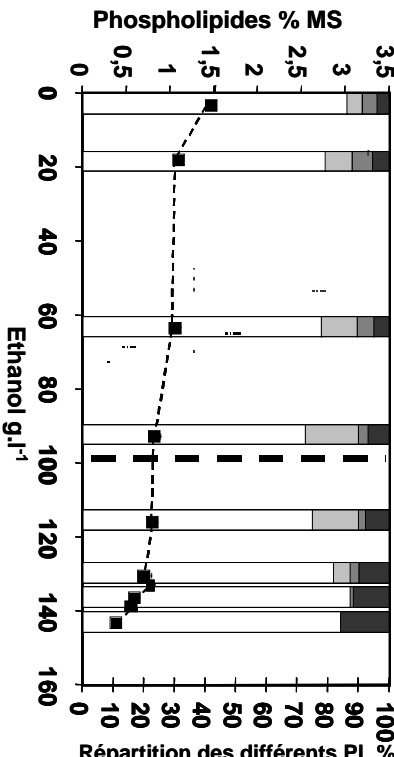
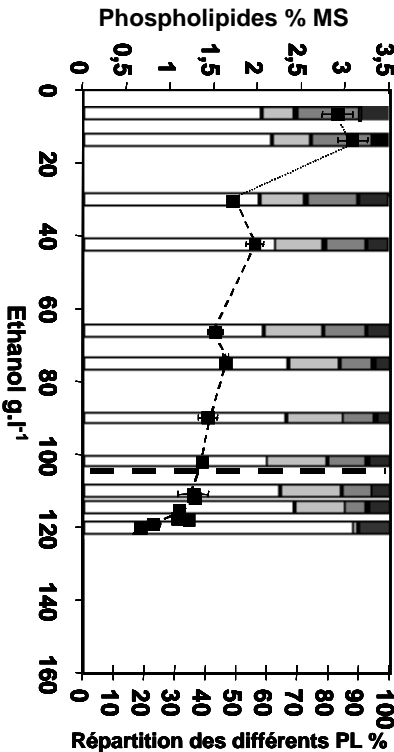
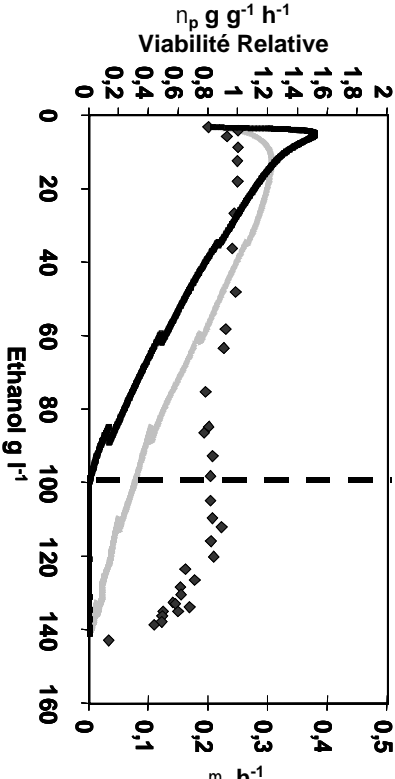


Figure 50 : Evolution, en fonction de la concentration en éthanol, du taux de croissance  $\mu$  (—), de la vitesse spécifique de production d'éthanol  $v_p$  (---), de la viabilité au bleu de méthylène ( $\Delta$ ), du contenu intracellulaire en phospholipides totaux ( $\Phi$ ), ramené à la masse sèche (% MS) de cellules, et de la répartition en Phosphatidyl -étanolamine (PE), Phosphatidyl -inositol (PI), Phosphatidyl-choïne (PC), Cardiolipide et Acide Phosphatidique (CL+PA) dans les phospholipides totaux.  
----- :arrêt de croissance séparant la phase de croissance de la phase de découplage.

En fait, en traçant l'évolution du contenu intracellulaire en phospholipides en fonction de la viabilité cellulaire mesurée au cours du procédé (cf. figure 51), une nette corrélation linéaire apparaît entre les deux paramètres mesurés. Les premiers points de fermentation n'ont pas été pris en compte pour la figure 51 (le premier pour la fermentation 4, les deux premiers pour la fermentation 3) car ils présentent des teneurs plus élevées en phospholipides. Ils correspondent à la phase de démarrage où les cellules issues de l'inoculum s'acclimatent aux conditions dans le réacteur.

Comme pour les stérols, l'évolution des teneurs intracellulaires en phospholipides est similaire pour les deux fermentations 3 et 4. Mais, dès le début des fermentations, les teneurs absolues en phospholipides sont différentes (de l'ordre de 1,8 % de la masse sèche pour la fermentation 3 et de 1 % de la masse sèche pour la fermentation 4).

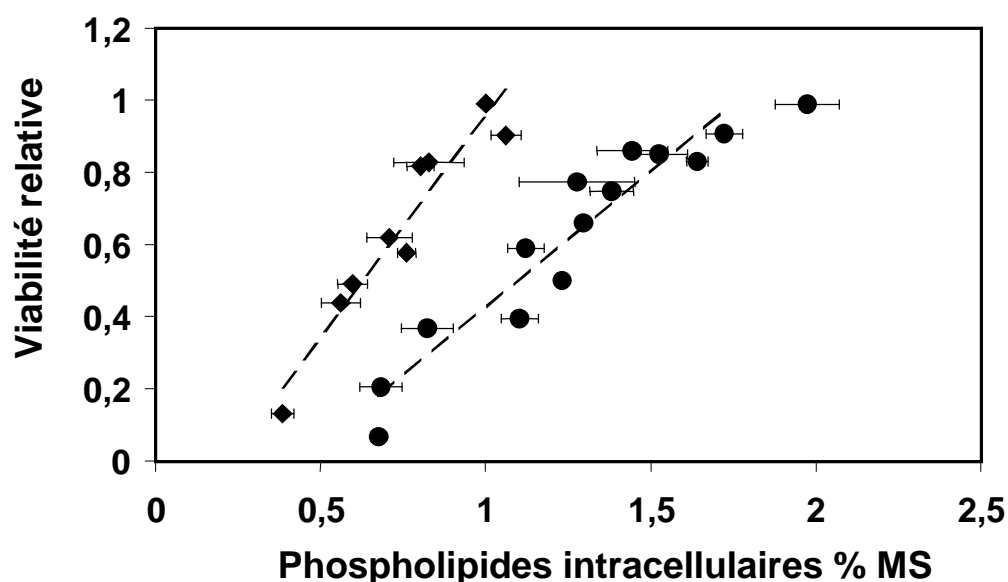


Figure 51 : Corrélation entre le contenu intracellulaire en phospholipides, rapporté à la masse sèche (% MS) de cellules, et la viabilité cellulaire relative mesurée au bleu de méthylène pour les fermentations 3 (○) et 4 (◇) ( $R^2=0,9$ ).



***b. Proportions des différents phospholipides cellulaires***

La phosphatidyl-choline PC est de loin le phospholipide le plus abondant dans nos extraits. Elle représente entre 60% et 90% des phospholipides totaux.

Les teneurs de tous les phospholipides n'évoluent pas de la même manière (cf. figure 50). Le contenu cellulaire en phosphatidyl-choline PC et phosphatidyl-éthanolamine PE diminue au cours du temps. Les proportions de PC et PE se maintiennent jusqu'au début de la perte de viabilité. A la fin du procédé, il n'y a pratiquement plus que de la PC et des cardiolipides CL+acide phosphatidique PA. En effet, PA+CL sont les seuls composés à s'accumuler en toute fin de procédé. Malheureusement, la séparation de ces deux composés sur plaque est difficile donc nous n'avons pu mesurer que la teneur cumulée CL+PA et nous ne savons donc pas lequel de ces composés s'accumule en fin de fermentation.

En revanche, le phosphatidyl-inositol PI a un comportement différent entre les deux fermentations. Présent en plus faible quantité dans la fermentation 4 (0,15 % MS au maximum, contre 0,3 % MS pour la fermentation 3), il s'accumule transitoirement avant l'arrêt de la croissance puis diminue rapidement, ce qui n'est pas le cas dans la fermentation 3, où il diminue plus lentement en suivant le même profil que PC et PE.

### **II.1.iii. Evolution des autres composés lipidiques : Glycérides, Acides gras et esters d'acides gras**

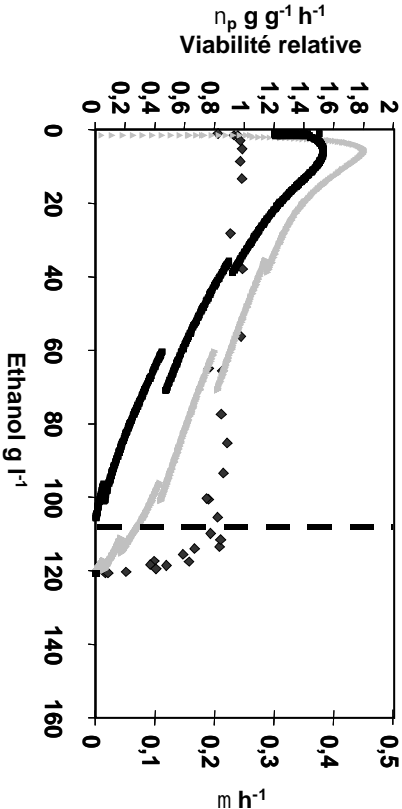
Seuls les acides gras, les triglycérides et les esters d'acides gras se retrouvent en quantité importante dans les extraits cellulaires (cf. figure 52). Les diglycérides représentent dans les deux fermentations moins de 0,1 % MS et cette teneur n'évolue pas au cours du temps.

Pour les triglycérides, les mêmes profils se retrouvent dans les deux fermentations : peu de modifications pendant la phase de croissance et accumulation pendant la phase de découplage. Pour la fermentation 4 (la plus performante), les triglycérides s'accumulent fortement dès l'arrêt de la croissance, passant de 0,6 à 1,1% MS. Comme pour les stérols et les phospholipides, même si les profils d'évolution des teneurs intracellulaires en triglycérides sont similaires dans les deux fermentations, il existe une différence de teneurs absolues pendant la phase de croissance (0,3 % MS pour la fermentation 3 et de 0,5 % MS pour la 4).

Dans les deux fermentations apparaissent des esters d'acides gras en fin de fermentation, pendant la phase de perte de viabilité.

Par contre pour les acides gras libres, nous obtenons des profils différents pour les deux fermentations. Dans la fermentation 4, les acides gras libres diminuent pendant la phase de croissance, de 1,2% à 0,6% MS. Ils se stabilisent autour de 0,4% MS au moment de la chute de viabilité. Par contre pour la fermentation n°3, ce contenu est déjà de 0,4 % MS au départ de la fermentation et oscille ensuite autour de cette valeur. La teneur initiale en acides gras libres est donc plus élevée dans la fermentation 4 que dans la fermentation 3, ce qui pourrait être en relation avec les différences de performances.

Fermentation 3



Fermentation 4

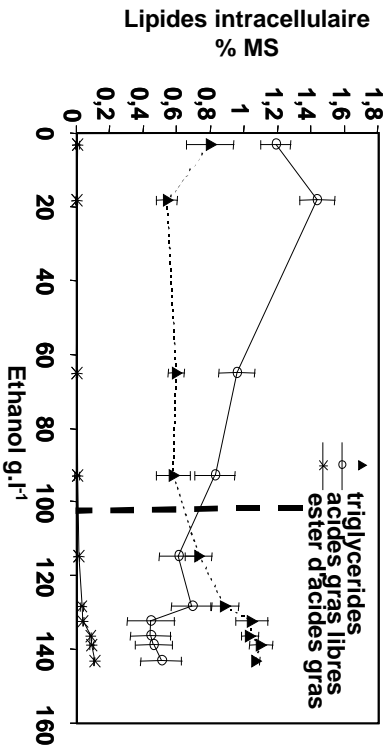
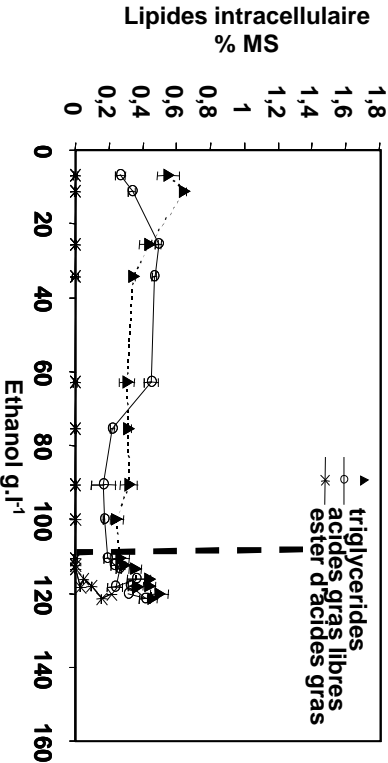
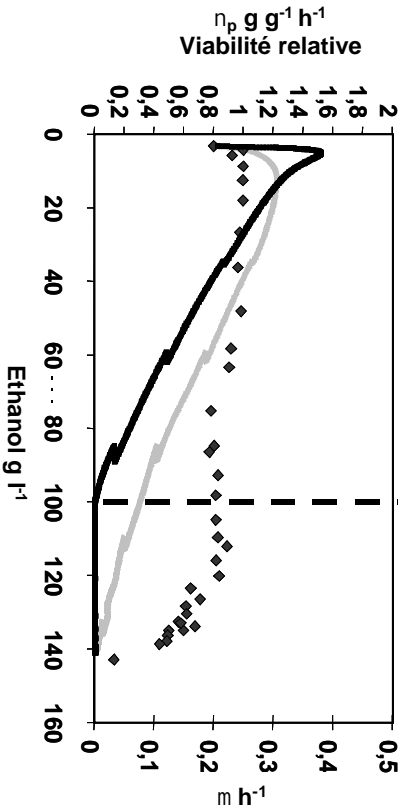


Figure 52 : Evolution, en fonction de la concentration en éthanol, du taux de croissance  $\mu$  (—), de la viabilité ( $\eta$ ), du contenu intracellulaire en triglycérides (▲), acides gras libres (○) et esters d'acides gras (---), rapportés à la masse sèche (% MS) de cellules pour les fermentations 3 et 4. - - - : arrêt de la croissance séparant la phase de croissance de la phase de découplage.

#### **II.1.iv. Evolution du contenu cellulaire en lipides totaux pendant les fermentations**

La figure 53 illustre l'évolution des contenus cellulaires en lipides totaux. Ces contenus ont été mesurés par gravimétrie.

Ce contenu diminue pendant la phase de croissance pour réaugmenter dans la phase de découplage à l'inverse de la perte de viabilité. Le même profil est obtenu lorsque sont ajoutés les différents lipides quantifiés par CCM (cf. figure 53). Donc, ce profil peut être en partie expliqué par les observations décrites ci dessus. Cependant, en faisant la somme des lipides identifiés par CCM, nous ne retrouvons qu'environ 45 à 65% des lipides totaux mesurés par gravimétrie. Nous savons que nous ne mesurons pas tous les lipides contenus dans l'extrait par CCM. Il y a potentiellement des stérols non identifiés par CCM, des lipides complexes (glycolipides, protéolipides...) et probablement des acides aminés (cf. partie III).

Il pourrait aussi y avoir des protéines hydrophobes. Cependant, nous n'avons pas réussi à en identifier la présence.

En utilisant une migration sur CCM (chloroforme/méthanol /eau, 40/10/1 v/v) avec l'orcinol (0,2g d'orcinol dans l'acide sulfurique 1,5 N) comme révélateur spécifique des sucres, nous avons mis en évidence la présence de sucres provenant probablement de glycolipides. Mais les glycolipides présents n'ont pas pu être identifiés.

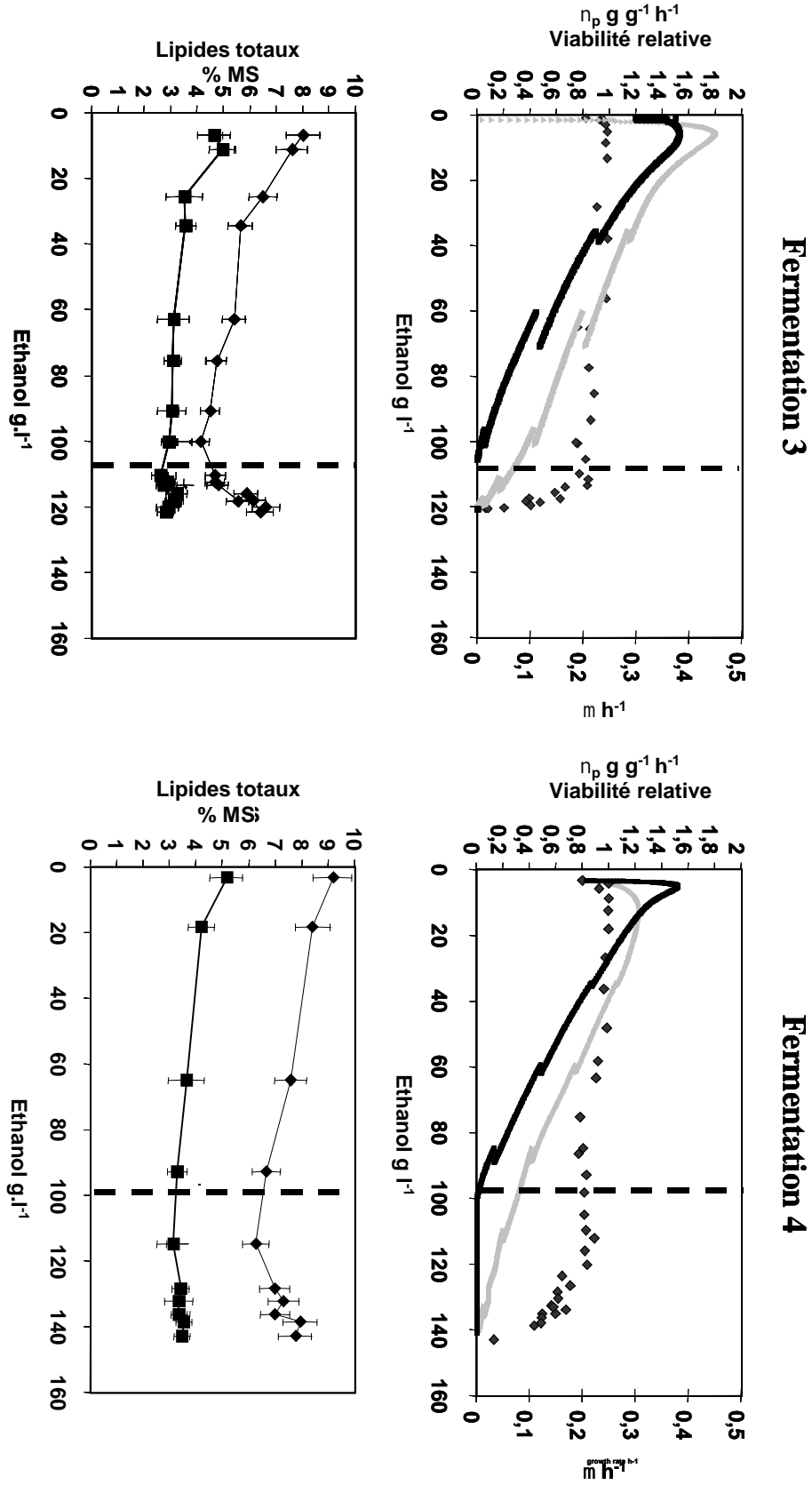


Figure 53 : Evolution, en fonction de la concentration en éthanol, du taux de croissance  $\mu$  (—), de la vitesse spécifique de production d'éthanol  $v_p$  (—), de la viabilité ( $\diamond$ ) ; des contenus intracellulaires, rapportés à la masse sèche (% MS) de cellules, en lipides totaux mesurés par gravimétrie (— $\square$ —) et par CCM (— $\diamond$ —) pour les fermentations 3 et 4. - - - : arrêt de la croissance séparant la phase de croissance de la phase de découplage.

### II.1.v. Evolution des compositions relatives dans les différents acides gras en fonction du degré d'insaturation et de la longueur de la chaîne

Une analyse des profils d'acides gras totaux a été réalisée après estérification (méthylation) sur les extraits lipidiques, et quantification des produits obtenus par chromatographie gazeuse. Nous nous sommes intéressés à deux paramètres : le degré d'insaturation et la longueur de la chaîne carbonée des acides gras. Le degré d'insaturation a été estimé par le calcul du ratio d'acides gras insaturés sur acides gras saturés :

$$\text{ratio.insaturés/saturés} = \frac{\sum(\text{acides.gras.insaturés})}{\sum(\text{acides.gras.saturés})} = \frac{C10:1+C12:1+C14:1+C16:1+C18:1+C18:2+C18:3}{C10:0+C12:0+C14:0+C16:0+C18:0}$$

L'évolution de la longueur de la chaîne carbonée en acides gras est évaluée par le calcul du ratio des acides gras les plus présents C16 et C18

$$C16/C18 = \frac{\sum(\text{acides.gras.à16C})}{\sum(\text{acides.gras.à18C})} = \frac{C16:0+C16:1}{C18:0+C18:1+C18:2+C18:3}$$

Nos échantillons contiennent entre 50 et 60 % de C16 (saturés et insaturés) et entre 35 et 45 % de C18 (insaturés et saturés). Le reste comprend des acides gras à plus courte chaîne (C10:0, C12:0, C14:0 et C14:1). Dans nos conditions, nous n'avons pas identifié d'acide gras à longue chaîne C20 et plus. Les acides gras poly-insaturés sont absents des extraits sauf à la fin de la fermentation 4.

Les deux fermentations 3 et 4 présentent les mêmes modifications en terme de composition en acides gras (cf. figure 54). Il semblerait y avoir une augmentation de la longueur de la chaîne pendant la phase de croissance. Le ratio C16/C18 diminue d'environ 30% pour les deux fermentations, puis il se maintient pendant la phase de découplage.

Le degré d'insaturation semblerait lui-aussi augmenter légèrement pendant la phase de croissance. Il semble décroître ensuite pendant la phase de découplage pour revenir pratiquement aux valeurs initiales. Cependant, dans les deux cas, les erreurs expérimentales ne nous permettent pas de conclure sur des modifications significatives du degré d'insaturation et de la longueur de la chaîne carbonée. Il faudrait refaire les analyses sur plus d'échantillons et sur plusieurs fermentations.

De plus, la différence de composition en acides gras est assez minime entre les deux fermentations. On ne peut pas conclure sur le rôle de ces derniers dans les différences de performances observées entre les deux fermentations.

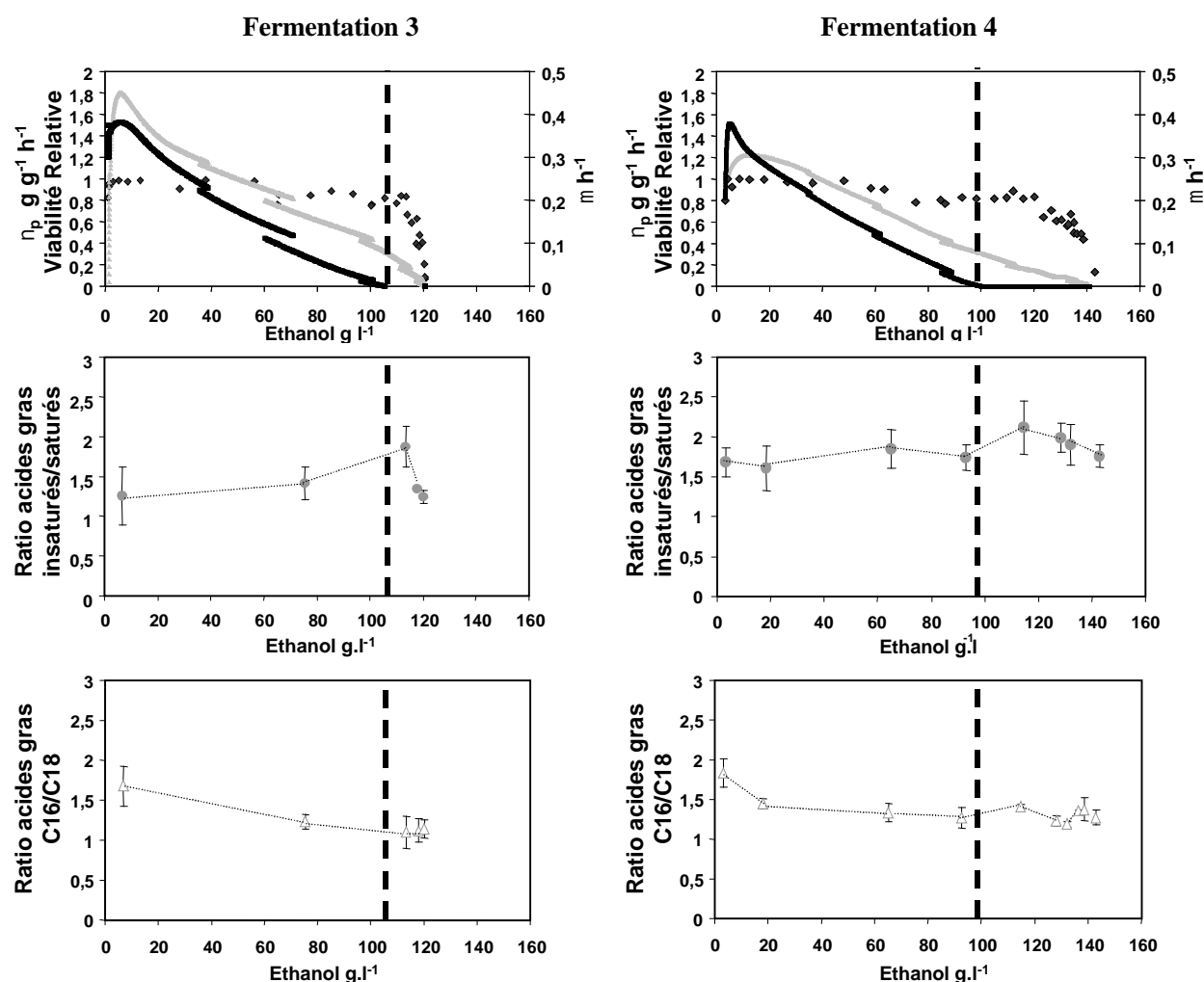


Figure 54 : Evolution, en fonction de la concentration en éthanol, du taux de croissance  $\mu$  (—), de la vitesse spécifique de production d'éthanol  $v_p$  (—), de la viabilité ( $\diamond$ ), des ratios intracellulaires en acides gras insaturés/saturés ( $\square$ ), et en acides gras C16/C18 ( $\triangle$ ) pour les fermentations 3 et 4. - - - : arrêt de la croissance séparant la phase de croissance de la phase de découplage

## **II.2. Impact de la production d'éthanol sur le contenu en sucres pariétaux**

Lors de l'analyse transcriptomique d'une fermentation alcoolique (cf. partie IV), nous avons mis en évidence qu'un certain nombre de gènes dont les produits sont impliqués dans la synthèse pariétale, étaient sur-exprimés surtout au moment de l'arrêt de la croissance. Cela suggérait des modifications au sein de la paroi cellulaire. C'est pourquoi, nous avons déterminé les teneurs en sucres pariétaux de ces parois.

Très peu de changements pariétaux se produisent au cours de la fermentation. Les teneurs en chitine restent constantes tout au long de la fermentation. Seul le rapport glucanes/mannanes évolue au profit d'une accumulation des glucanes au détriment des mannanes, pendant la phase de croissance. Le contenu en glucanes passe de 49 % à 59 % de la masse sèche pour la fermentation 4 et 30 % à 51 % de la masse sèche pour la fermentation 3. Il y a peu de remaniements des principaux sucres pariétaux lors des deux fermentations étudiées. Cependant, il faut souligner que nous ne nous sommes intéressés qu'aux grandes familles de sucres pariétaux. Il peut y avoir des remaniements au niveau de l'architecture pariétale, comme par exemple dans les liaisons  $\beta$ -1-6 et  $\beta$ -1-3 des glucanes.

Pour la fermentation 4, la teneur totale en sucres de paroi reste toujours autour de 20 % MS au cours du processus de production d'éthanol. Pour la fermentation 3, cette teneur est autour de 15 % MS pendant la phase de croissance et elle augmente pendant la phase de découplage pour atteindre les 20 % MS (cf. figure 55). Les différences de teneurs totales en sucres pariétaux et de répartitions glucane/mannane pourraient être liées à la différence de performance. Mais il faudrait faire des expériences complémentaires sur d'autres fermentations pour confirmer cette hypothèse.



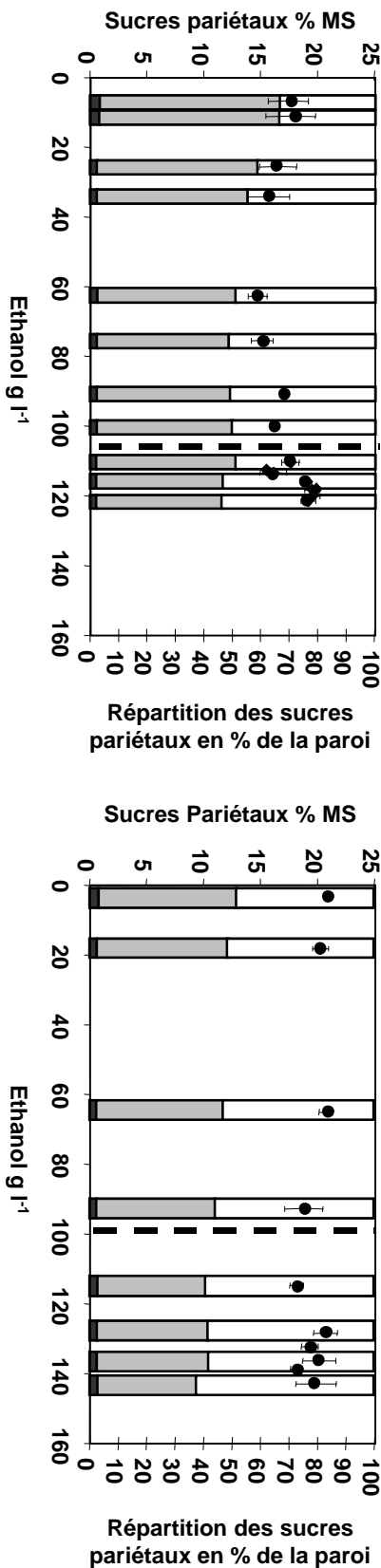
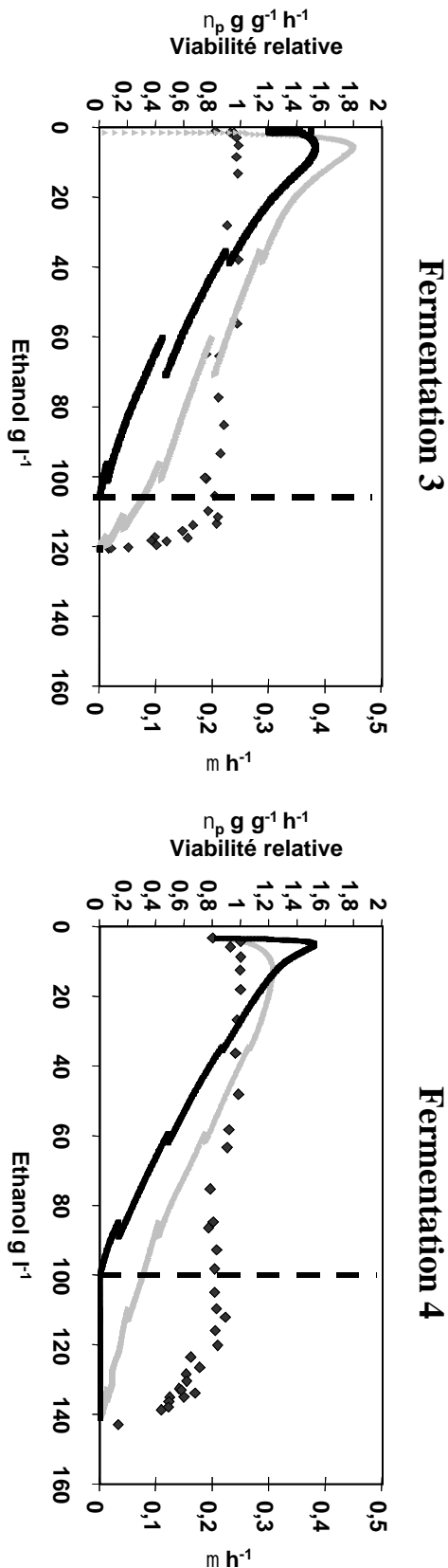


Figure 55 : Evolution, en fonction de la concentration en éthanol, du taux de croissance  $\mu$  (—), de la viabilité  $\nu_p$  (—), du contenu intracellulaire en paroi (—) rapporté à la masse sèche (% MS) en cellules et de la répartition des sucres pariétaux au sein de la paroi : mannanes (Φ), glucanes (E) et chitine (Φ) pour les fermentations 3 et 4. - - - : arrêt de la croissance.

### III. Conclusion de la partie VI

Afin de comprendre les mécanismes mis en place par la levure pour s'adapter à sa propre production d'éthanol, nous avons choisi de comparer deux fermentations de performances différentes. Les fermentations 3 et 4 ont des modes d'apport du glucose légèrement différents. Mais les différences de performances entre les fermentations 3 et 4 ne peuvent s'expliquer par la différence d'apport du glucose car la fermentation 3 est sensée être la reproduction de la fermentation 2, qui avait donné des performances similaires à la fermentation 4 (cf. partie IV). Il est cependant intéressant de comparer ces deux fermentations car elles n'ont pas atteint les mêmes performances et nous pouvons espérer identifier des différences métaboliques et physiologiques qui pourraient rendre compte de ces différences de performances du procédé. Il est connu que lors de fermentations alcooliques dans nos conditions, l'inhibition par l'éthanol est prépondérante mais n'est pas toujours reproductible (Baudet 1990). A travers ces deux fermentations, nous pouvons identifier des mécanismes communs vis-à-vis de l'accumulation d'éthanol et différents qui peuvent être liées à la différence de performances.

Pour les deux fermentations, la perte de viabilité des cellules est concomitante à une fuite massive des métabolites intracellulaires hors de la cellule. Salgueiro *et al.* ont déjà observé un relargage d'acides aminés et de composants absorbant à 260 nm, après addition de 18% (v/v) d'éthanol dans le milieu (Salgueiro *et al.* 1988). De même, Gonzales *et al.* (1997) observent la présence de métabolites intracellulaires dans le surnageant et rejettent l'hypothèse de l'excrétion de ces métabolites. Ils privilégient l'hypothèse d'une perméabilisation et/ou d'une lyse cellulaire, surtout qu'ils observent au même moment 20% de cellules colorées en bleu après par le bleu de méthylène. Dans notre cas, il s'agit aussi probablement d'une perméabilisation des cellules due à une perte d'intégrité membranaire provoquée par la présence d'éthanol. Cette perte d'intégrité membranaire va induire une perte du gradient de protons. Cet effet est alors plus conséquent qu'une simple perturbation du gradient de protons à travers la membrane plasmique et que l'inactivation des systèmes de transport, décrits dans la littérature sur l'effet de l'éthanol sur la membrane (Alexandre *et al.* 1996; D'Amore *et al.* 1990; Jones et Greenfield 1987; Leao et van Uden 1984; Walker-Caprioglio *et al.* 1990). Cependant, nous ne pouvons pas conclure exactement sur l'enchaînement entre perte de viabilité et perte d'intégrité membranaire. La perte d'activité métabolique peut-être la conséquence d'une inhibition des activités enzymatiques par l'éthanol, et survenir avant la perméabilisation. La perméabilisation proviendrait alors d'une inhibition des enzymes liées à

la formation des membranes cellulaires ou d'une dégradation post-mortem (par exemple, de type « autolyse » (Arnold 1981;Kollar *et al.* 1993a;Kollar *et al.* 1993b;Pueyo *et al.* 2000). Mais cela peut aussi être dû à la dégradation de la membrane par action de l'éthanol qui conduit à l'arrêt de toute activité métabolique.

Une étude préliminaire de la composition macromoléculaire des levures au cours des fermentations alcooliques, nous a permis de mettre en évidence une accumulation des carbohydrates au détriment des protéines et des acides nucléiques. Après analyses plus approfondies, cette accumulation de carbohydrates correspond à l'accumulation de réserves par la cellule sous forme de glycogène et de tréhalose, mais elle n'est pas en relation avec la composition en sucres (mannose, glucose) de la paroi cellulaire. Il est probable que les changements pariétaux se situent plus au niveau structurel qu'au niveau de leur composition.

Tréhalose et glycogène sont tous les deux appelés sucres de réserves, cependant ils ont des rôles différents au sein de la cellule ; c'est pourquoi ils ne s'accumulent pas nécessairement de la même manière. La fonction majeure du glycogène semble être le stockage de carbone et d'énergie pour la maintenance des activités cellulaires en cas d'environnement défavorable (François et Parrou 2001). Le tréhalose peut aussi servir de stockage de carbone et d'énergie. Mais, il semble qu'il ait un rôle clé dans la résistance au stress. Il a été prouvé que le tréhalose est impliqué dans la protection contre des variations de pression osmotique (Blomberg 2000). Le tréhalose peut aussi protéger contre l'autolyse (François et Parrou 2001), contre les fortes températures et contre la dessiccation, en stabilisant les protéines et en maintenant l'intégrité membranaire en interagissant avec à la fois les protéines et les phospholipides (Blomberg 2000;Felix *et al.* 1999). Dans nos expériences, le tréhalose et le glycogène s'accumulent différemment suivant les fermentations étudiées. Plus ils s'accumulent, plus la fermentation est performante : la perte de viabilité est repoussée vers des concentrations en éthanol plus élevées et la concentration finale en éthanol est supérieure. L'hypothèse du rôle du tréhalose comme protecteur des levures en présence d'éthanol a déjà été émise. Certains auteurs suggèrent que le tréhalose permet d'empêcher, ou de ralentir certains effets perturbateurs de l'éthanol au niveau de la membrane plasmique (Mansure *et al.* 1997). Il aurait une action protectrice contre les fuites d'ions en présence d'éthanol sur des liposomes artificiels (Mansure *et al.* 1994). Cependant, d'autres études remettent en cause une corrélation directe entre la tolérance au stress et le contenu intracellulaire en tréhalose lors de choc éthanol et thermique (Alexandre *et al.* 1998;Nwaka *et al.* 1994;Swan et Watson 1998). Dans notre cas, pour la fermentation la plus performante où la viabilité se maintient plus longtemps, le

tréhalose s'accumule fortement en fin de fermentation à de très hautes concentrations en éthanol quand la viabilité cellulaire commence à chuter. Le tréhalose ne serait donc pas le facteur déterminant de la résistance des levures dans nos conditions. Il semble être seulement la conséquence d'autres changements physiologiques de la levure.

Dans la fermentation la plus performante (n°4), les données cinétiques sur les réserves rappellent l'accumulation de tréhalose et de glycogène lors d'une culture de type batch, au moment de la limitation en glucose (Lillie et Pringle 1980; Parrou *et al.* 1999). Dans ce cas, ces changements sont interprétés comme une capacité de la levure à anticiper la limitation en glucose et donc à stocker des réserves avant que la source de carbone du milieu ne s'épuise. Ces réarrangement métaboliques conduisent à l'acquisition d'un état de « quiescence » ou de phase stationnaire (Werner-Washburne *et al.* 1996). Cependant, dans notre procédé fed-batch, ces changements physiologiques ne sont pas dus à une limitation en source carbonée, car la concentration en glucose dans le milieu reste toujours supérieure à 5 g.l<sup>-1</sup>. Ils ne peuvent pas être la conséquence d'une limitation en source azotée car l'ammonium est rajouté dans le milieu de manière excédentaire. Nous émettons l'hypothèse que la perméabilisation de la membrane des cellules et l'action inhibitrice de l'éthanol sur les systèmes de transport simuleraient une carence dans le milieu car les éléments ne peuvent plus être assimilés. Ces perturbations induiraient alors une réponse de la cellule en partie semblable à celle rencontrée en cas de carence. Il est intéressant de noter que cette accumulation de réserves en carbohydrates n'a pas été observée dans la fermentation la moins performante (n°3), même si une faible induction de glycogène et de tréhalose est visible avant la phase de découplage. Ces résultats suggèrent que la population de cellules de cette fermentation n'a pas pu acquérir cet état physiologique qui semble donc nécessaire à une production d'éthanol plus importante.

Dans la fermentation la plus performante, en plus d'accumuler des réserves sous forme de carbohydrates, les cellules accumulent aussi des réserves sous formes de triglycérides, ce qui est aussi connu pour être caractéristique des cellules en phase stationnaire (Rattray 1988; Sandager *et al.* 2002). La délétion de gènes empêchant la synthèse de ces réserves lipidiques n'a pas d'influence sur la phase de croissance mais influence la survie à long terme en phase stationnaire (Sandager *et al.* 2002). Parallèlement à ces accumulations, le contenu en phospholipides cellulaires diminue fortement, lors de la phase de découplage de nos fermentations alcooliques. Les études faites sur l'éthanol suggèrent l'importance de certains lipides, notamment les acides gras insaturés, les phospholipides et l'ergostérol. Certains

permettent de contrecarrer l'effet fluidifiant de l'éthanol sur la membrane plasmique en la rigidifiant, et de maintenir l'intégrité membranaire face à la présence d'éthanol. La perte du contenu en phospholipides cellulaires en corrélation avec la perte de viabilité pourrait être une cause de la perte d'intégrité de la membrane plasmique. En effet, nous avons vu que l'effet de l'éthanol en fin de fermentation semble plus spectaculaire que ce qui a déjà été décrit dans la littérature, c'est-à-dire une perméabilisation des membranes qui perturbe le gradient de protons et inhibe les systèmes de transport actif (Alexandre *et al.* 1996; D'Amore *et al.* 1990; Jones et Greenfield 1987; Leao et van Uden 1984; Walker-Caprioglio *et al.* 1990). En effet, dans notre cas, il y a fuite du contenu intracellulaire ce qui dénote une importante perte d'intégrité membranaire. De plus, cette hypothèse est renforcée par d'autres études qui soulignent l'importance du contenu membranaire en lipides, en particulier le maintien des phospholipides dans la tolérance à l'éthanol (Alexandre *et al.* 1994b; Chi et Arneborg 1999; Koukou *et al.* 1990), et par le fait que la complémentation du milieu en phospholipides améliore la résistance des levures à l'éthanol (Mishra et Prasad 1988). Pourquoi le contenu en phospholipides diminue-t-il ? Nous sommes dans une phase de non-croissance donc cette diminution ne peut être directement due à une inhibition de la synthèse '*de novo*' des phospholipides. Une hypothèse, déjà émise par certains auteurs (D'Amore *et al.* 1990), est la possibilité que l'éthanol puisse extraire ces lipides et/ou se substituer à eux dans les membranes. Dans notre cas, nous n'avons pas pu vérifier la présence de phospholipides dans le milieu de fermentation, donc nous ne pouvons pas conclure si les phospholipides sont dégradés ou libérés dans le milieu. Cependant, lors de l'étude des phénomènes d'autolyse dans des conditions de fermentation vinicole, les levures sont mises en contact pendant plusieurs jours avec un milieu modèle synthétique contenant 10 % (v/v) d'éthanol (Pueyo *et al.* 2000) et les auteurs ont recherché la présence de lipides cellulaires dans le milieu. Ils retrouvent dès le premier jour d'incubation des quantités non négligeables de lipides. Ils trouvent en majorité des triglycérides et des esters de stérols mais aussi des mono- et diglycérides, des acides gras libres et des stérols. Par contre, il n'y a aucune trace de phospholipides. Ils supposent donc que ces derniers sont hydrolysés pendant le phénomène d'autolyse. De même, Casey *et al.*, 1986 parle déjà d'une lypolyse des membranes suite à l'action de 20% d'éthanol. Cette hypothèse n'a pas été développée dans la littérature car les fermentations n'atteignent que très rarement ces performances.

En conclusion, pendant la phase de découplage de la fermentation la plus performante, les levures acquièrent des caractéristiques de cellules en phase stationnaire ou état de quiescence

(arrêt de croissance, accumulation de réserves lipidiques et carbonées), classiquement obtenues après limitation en nutriments essentiels (Gray *et al.* 2004). Or, dans notre cas, aucune limitation nutritionnelle n'a pu être mise en évidence. Nous faisons donc l'hypothèse que ce passage à un état particulier proche de l'état de quiescence est dû à l'accumulation d'éthanol. Il est connu que les cellules ayant atteint cet état physiologique sont plus résistantes à une variété de stress environnementaux (Herman 2002). Pour la fermentation la moins performante, il n'y a peu d'accumulation de réserves et de triglycérides. L'acquisition de cet état physiologique semble donc important dans le maintien d'une activité cellulaire pendant la phase de découplage. Nous sommes en présence d'une population mixte en fin de fermentation : il y a des cellules viables ayant encore une activité métabolique et des cellules mortes ou en train de mourir. Or nous mesurons des paramètres globaux. Deux hypothèses se présentent. Premièrement, les cellules viables sont celles qui doivent acquérir cet état particulier avec accumulation de réserves carbonées et lipidiques leur permettant de résister plus longtemps à l'éthanol. Les cellules mortes ou mourantes n'ont pu acquérir cet état, l'intégrité membranaire est perdue ce qui conduit à la perméabilisation de la membrane. Deuxièmement, les cellules non viables se vident d'une partie de leur contenu intracellulaire et leur masse sèche s'enrichit artificiellement en certains composés non libérés dans le milieu. Les différences de performances peuvent s'expliquer par des difficultés à reproduire exactement les mêmes conditions de culture. Mais, la comparaison des contenus cellulaires des deux fermentations suggère un rôle primordial de la qualité de l'inoculum. En effet, les teneurs initiales en lipides ou sucres pariétaux diffèrent d'une fermentation à l'autre. Même si les profils d'évolution sont par la suite similaires dans les deux fermentations, la différence dans la teneur de ces macromolécules se conserve jusqu'à la fin du procédé. Par exemple, il y a plus de stérols et moins de phospholipides dans la fermentation la plus performante (n°4) ce qui est en accord avec le fait qu'une souche soit d'autant plus tolérante à l'éthanol que son ratio ergostérol/phospholipides est élevé (Chi et Arneborg 1999; Del Castillo Agudo 1992; Swan et Watson 1998). L'état des cellules dans l'inoculum doit donc avoir une influence sur le déroulement de la fermentation et notamment sur la capacité des levures à s'adapter à l'accumulation d'éthanol. A l'avenir, il serait donc intéressant de caractériser l'inoculum de plusieurs fermentations afin de rechercher l'existence d'un paramètre physiologique, morphologique ou métabolique qui corrèlerait avec la performance de la production finale en éthanol. Ce paramètre pourrait alors servir de baromètre pour la qualité des fermentations.

# **Conclusion générale et perspectives**





Beaucoup de travaux ont été réalisés pour comprendre les phénomènes de tolérance à l'éthanol mais peu ont été effectués en conditions de production dynamique. L'étude de l'adaptation dynamique de la levure à des concentrations croissantes en éthanol est un sujet difficile et complexe. L'originalité, mais aussi la difficulté de ce travail était d'appréhender la notion de tolérance à l'éthanol en conditions de productions intensives proches des conditions industrielles. Nous disposons d'un procédé de fermentation fed-batch aéré qui permettait d'atteindre la production de 147 g.l<sup>-1</sup> d'éthanol en 45h (Alfenore *et al.* 2002). Ce type de fermentations est sensible à la maîtrise de chaque étape ce qui entraîne une certaine variabilité dans le titre final, mais il garantit d'atteindre au moins 120 g.l<sup>-1</sup> d'éthanol. Les variations dans les performances de ces fermentations dépendent de l'état physiologique de la levure, lequel sera conditionné par l'origine de l'inoculum, la conduite du réacteur, la façon d'alimenter les cultures, la composition du milieu de culture. Comment stabiliser la production à un niveau élevé ? Le titre final peut-il être encore augmenté ? Est-il possible de préparer les levures à mieux tolérer les fortes concentrations en éthanol produit ?

Pour répondre à ces questions, il a d'abord fallu caractériser ces fermentations d'un point de vue physiologique afin de comprendre les phénomènes observés. La levure est soumise à des contraintes extrêmes dues à la production élevée d'éthanol. La performance du procédé va donc dépendre de la capacité de la levure à mieux s'adapter à ces conditions.

### ***La performance du procédé est liée au maintien de l'activité métabolique***

A ce niveau de performance, l'orientation du métabolisme vers la production de biomasse et de glycérol ne suffit pas à expliquer les différences de titre éthanolique. La performance du procédé est liée au maintien de la production d'éthanol pendant la phase de découplage entre la croissance et la production d'éthanol où la cellule produit exclusivement de l'éthanol. La phase de découplage se caractérise par une perte de viabilité qui semble due à une perte d'activité métabolique des cellules et qui provoque l'arrêt de la fermentation. Cette perte d'activité métabolique va engendrer la perte des gradients osmotiques et donc conduire à la mort cellulaire. On peut supposer que la cellule constitue encore un sac d'enzymes pouvant transformer le glucose en éthanol mais avec une efficacité de plus en plus réduite. La comparaison de plusieurs fermentations, nous indique que les clés d'une performance résident dans la capacité de la levure à maintenir le plus longtemps possible une activité métabolique élevée. Ceci revient à dire que la levure doit démontrer une meilleure capacité à résister aux conditions stressantes induites par l'accumulation d'éthanol.

### ***La perte d'activité métabolique corrèle avec une perméabilisation de la membrane***

La perte d'activité métabolique, que nous assimilons à une perte de « viabilité », est corrélée à la fuite de métabolites intracellulaires (ATP, ADP, AMP, sucres phosphorylés....). Une telle fuite ne peut-être due à une excrétion volontaire des levures. L'éthanol est déjà connu pour provoquer des perturbations au sein de la membrane (Alexandre *et al.* 1996;D'Amore *et al.* 1990;Jones et Greenfield 1987;Leao et van Uden 1984;Walker-Caprioglio *et al.* 1990). Mais à ce niveau de concentrations, il ne s'agit plus de simple modification du flux de protons ou des activités des transporteurs membranaires, mais bien d'un problème pour la levure à retenir son contenu intracellulaire qui ne peut s'expliquer que par une perte de l'intégrité membranaire de la cellule.

### ***Les dommages membranaires pourraient s'expliquer par une perte du contenu en phospholipides***

L'analyse des contenus en lipides montre clairement une nette corrélation entre le contenu en phospholipides des membranes et la viabilité. Ces dommages membranaires sont probablement irréversibles. Le maintien des activités cellulaires semble donc dépendre de la capacité de la levure à lutter contre l'action de l'éthanol sur sa membrane. L'adaptation de la levure doit dépendre de sa capacité à maintenir son contenu en phospholipides (Alexandre *et al.* 1994b). Mais les questions encore sans réponse sur le mode d'action de l'éthanol sont entre autres : l'éthanol agit-il comme un solvant pour extraire les lipides de la membrane ? De part sa nature amphiphile s'intercale-t-il dans les membranes à la place des phospholipides ? Induit-t-il un processus d'activation qui engendre la dégradation des phospholipides ?

### ***La cellule adapte-t-elle sa composition lipidique à la présence d'éthanol ?***

Pendant la phase de croissance, en dehors de la composition en phospholipides, la composition lipidique des levures varie peu. Pendant la phase de démarrage (5-6h de fermentation), la composition lipidique évolue, puis elle stagne jusqu'à l'arrêt de la croissance. Malgré l'accumulation d'éthanol dans le milieu jusqu'à environ 100 g.l<sup>-1</sup>, nous n'avons pas mis en évidence de changements significatifs au niveau de la composition en stérols. Par rapport aux données de la littérature (Ghareib *et al.* 1988;Sajbidor *et al.* 1995), nous nous attendions à des changements beaucoup plus significatifs. Dans la fermentation la plus performante, les levures sont plus riches en stérols donc il se peut qu'une complémentation du milieu en stérols permette d'obtenir un titre final en éthanol élevé. Après

arrêt de la croissance, les lipides neutres s'accumulent, sous forme d'ergostérol, mais surtout de réserves lipidiques (triglycérides et esters de stérol).

### ***L'acquisition d'un état physiologique particulier au moment du découplage croissance-production pourrait être un élément déterminant pour l'adaptation aux fortes concentrations en éthanol***

Le suivi de l'expression des gènes révèle la mise en place d'une réponse générale au stress, qui commence pendant la phase de croissance mais qui prend toute son ampleur au moment du découplage entre croissance et production où la croissance du microorganisme est arrêtée.

A ce moment du procédé, qui se situe autour de 100 g.l<sup>-1</sup> d'éthanol, les cellules semblent entrer dans un état physiologique particulier proche d'un état de « quiescence » mais la cellule continue à exprimer une activité cellulaire suffisante pour rendre compte de la production d'éthanol. Au niveau microscopique, les cellules sont de moins en moins bourgeonnantes. Les gènes liés à la transcription et à la traduction sont sous-exprimés. Les réserves en carbohydrates et lipides s'accumulent et certains gènes caractéristiques de l'entrée en état de phase stationnaire sont induits (*SSA3*, *SPII*, *HSP12*, *HSP26*...)... L'acquisition de cet état par une partie de la population de levures semble déterminante pour la longueur de la phase de découplage et donc la performance du procédé. Il est en effet connu que des cellules en état de phase stationnaire sont plus résistantes au stress (notamment à la présence d'éthanol....) (Herman 2002).

Cependant, là aussi il reste des questions sans réponse : Quel est le signal qui provoque cette acquisition d'état physiologique et comment se met-il en place ? De quel type de signal s'agit-il ? Plusieurs signaux sont peut-être nécessaires à différents stades de la fermentation pour l'acquisition de cet état. L'état de quiescence se rencontre souvent après une carence nutritionnelle en un nutriment essentiel (carbone, azote, soufre, phosphate...) (Gray *et al.* 2004). Or ces éléments sont présents en excès dans nos conditions. Mais, l'éthanol est connu pour inhiber les systèmes de transports actifs (Alexandre *et al.* 1996; D'Amore *et al.* 1990; Jones et Greenfield 1987; Leao et van Uden 1984; Walker-Caprioglio *et al.* 1990). L'éthanol simule-t-il une carence nutritionnelle par inhibition des transporteurs, comme le suggère la sur-expression de nombreux gènes de transport ?

Un projet a déjà été initié afin de comparer deux fermentations de performances différentes d'un point de vue transcriptomique. L'hypothèse est que dans la première fermentation, une majorité de cellules arrive à maintenir l'activité métabolique et à acquérir cet état, ce qui n'est pas le cas pour la deuxième fermentation. La technologie des puces à ADN nous fournira les gènes qui sont différentiellement exprimés entre les deux cas. Nous espérons ainsi mettre en évidence l'induction de gènes connus pour être caractéristiques de l'état de quiescence dans une fermentation mais pas dans l'autre.

Lors de cette thèse nous nous sommes heurtés à un problème récurrent, à savoir l'hétérogénéité de la population de levures en fin de fermentation. En effet, nous avons identifié au moins cinq populations distinctes. De même, en phase stationnaire, après carence en glucose, Allen *et al.* (2006) identifient deux populations qu'ils arrivent à séparer : les cellules quiescentes et non quiescentes. Elles présentent des propriétés différentes. Les cellules quiescentes sont plus denses, accumulent du glycogène, sont des cellules filles (sans cicatrice pour 91%) et ne présentent pas le même profil transcriptomique que les cellules non-quiescentes. Dans notre cas, il serait aussi intéressant de pouvoir séparer, par cytométrie en flux ou par gradient de densité, les différentes populations pour pouvoir les étudier indépendamment. Certaines sont responsables du maintien de l'activité métabolique, d'autres sont définitivement mortes. Nous pourrions ainsi envisager de répondre à quelques questions : Quelle(s) population(s) contribue(nt) à la production d'éthanol ? Les modifications lipidiques (perte de phospholipides, accumulation de lipides neutres...) touchent-elle les cellules actives ? Les cellules, apparemment bourgeonnantes, sont-elles bloquées dans leur cycle ou continuent-elles leur division ? Quelle(s) population(s) a(ont) les caractéristiques de cellules en état de quiescence ? Quels sont les gènes différentiellement exprimés spécifiquement à chaque population ?

De plus, pour approfondir la caractérisation de la biomasse, il faudrait s'intéresser aux propriétés de la membrane car la membrane semble être la cible privilégiée de l'éthanol. Il est connu pour agir sur la fluidité membranaire (Alexandre *et al.* 1994b; Ghosh 1988). De plus, la perte d'intégrité membranaire doit aussi se traduire au niveau des protéines présentes dans la membrane. Il serait donc intéressant de suivre l'évolution du protéome de la membrane plasmique (Delom *et al.* 2006) afin d'identifier si des protéines disparaissent, voire apparaissent, dans la membrane.

Une autre perspective d'approche de la résistance à l'éthanol est d'essayer de comprendre comment les levures, par variations génétiques naturelles, parviennent à développer des propriétés intéressantes pour la fermentation alcoolique. Pour cela, une étude a déjà été initiée au sein du laboratoire pour sélectionner des souches plus résistantes à différents stress, dont la présence d'éthanol, par évolution dirigée. Ensuite, la relation génotype-phénotype des mutants sélectionnés sera analysée par des méthodes génétiques, microscopiques, génomiques, transcriptomiques, biochimiques et métaboliques.



# **Annexe**





# Annexe 1

Niveaux d'expression\* dans nos conditions de fermentation (pour les prélèvements 3, 4 et 5), en cas de choc éthanol (Alexandre *et al.* 2001) et lors la Réponse Commune aux changements Environnementaux CER (Causton *et al.* 2001) pour les gènes sous contrôle des facteurs de transcription Msn2/4 et HSF

ORF	Gène	Echantillon			Choc Ethanol	CER
		3	5	6	(Alexandre <i>et al.</i> 2001)	(Causton <i>et al.</i> 2001)
YDR216W	ADR1		+	+		++
YLR109W	AHP1	+	+	+		
YLR109W	AHP1	+	+	+		
YMR169C	ALD3	+			++	
YOR374W	ALD4	+	+	+	++	++
YNL077W	APJ1		+		++	++
YDL197C	ASF2		+	+	++	
YKR066C	CCP1		+	+		
YLR178C	CDC25	+	+	+		
YDR155C	CPR1	-	-	-		
YLR216C	CPR6	+	+	+	+++	
YGR088W	CTT1	+			+++	++++
YML101C	CUE4		+	+		
YHR053C	CUP1-1	+	+++	+++		
YHR055C	CUP1-2	++	+++	+++		
YEL039C	CYC7	+++	+++	?	++	++++
YJL005W	CYR1		+	+		
YOR173W	DCS2	+	+	+	++	+++
YMR173W	DDR48	+++	+	+		++
YER035W	EDC2		+	+		
YHR174W	ENO2	+	+	+		
YAL061W	FUN50	+	+	+	++	+++
YOR178C	GAC1	+	++	+		
YDR096W	GIS1		+			
YCL040W	GLK1	+	+	+	+++++	++
YDR508C	GNP1		+	+		
YHR104W	GRE3	+	+	+	++	++++
YCL035	GRX1	+++	+++	++	++	++
YMR251WA	HOR7	+	+++	+++	+++	
YMR185W	HSC82		+	+	++	
YGL073W	HSF1		+	+		
YOR020C	HSP10		+++	+++		

\*+ : induit 1,5 à 2,5 fois; ++ : induit 2,5 to 3,5 fois; +++ : > 3,5 fois; +++++, > 7 fois; ++++++ : > 20 fois

ORF	Gène	Echantillon			Choc Ethanol	CER
		3	5	6	(Alexandre <i>et al.</i> 2001)	(Causton <i>et al.</i> 2001)
YLL026W	HSP104	++	+	+	+++	++
YFL014W	HSP12	+	++	++	++++	++++
YBR072W	HSP26	+++	+++	+++	+++++	+++++
YCR021C	HSP30	+	+++	+++	++	++
YDR171W	HSP42	+	+++	++	+++++	++
YLR259C	HSP60		+	+		+
YDR258C	HSP78	+	+		+++	++
YPL240C	HSP82	+	+	+	+	
YFR053C	HXK1	+	+	+	++	++
YDR342C	HXT7	+	+	+		
YKL032C	IXR1		+	+	+	
YJL034W	KAR2	+	+	+	++	
YKL150W	MCR1	+	+	+	++	
YIR017C	MET28	+	+	+		
YML128C	MSC1	+			+++	+++
YLR219W	MSC3		+	+	+	
YBR001C	NTH2		+	+	++	
YOR360C	PDE2	-	-	-		
YMR105C	PGM2	++	+	+	+++	+++
YER037W	PHM8		+	+	+++	++
YKL163W	PIR3	+	+	+	+	
YGL006W	PMC1		+	+	++	++
YGL037C	PNC1	+	+	+	+++	++
YDL134C	PPH21		+	+		
YBR049C	REB1		+	+		
YDL020C	RPN4		+	+	++	++
YOR184W	SER1	-	-	-		
YMR175W	SIP18	-	-	-		
YNL007C	SIS1		+	+	+++	
YHR008C	SOD2	+	+	+		
YNR034W	SOL1	+++	+++	+++	+	++
YGR248W	SOL4	+	+	+	++	+++
YDR504C	SPG3		-	-		
YER150W	SPI1	+	+++	+++	+	++++
YHR139C	SPS100		+		+++	++
YAL005C	SSA1	+	+	+	++	
YLL024C	SSA2	+	+		+	
YBL075C	SSA3		+	+	++	++
YER103W	SSA4	+	++	+	+++++	++++
YBR169C	SSE2	+	+	+	++	++

\*+ : induit 1,5 à 2,5 fois; ++ : induit 2,5 to 3,5 fois; +++ : > 3,5 fois; +++++, > 7 fois; ++++++ : > 20 fois

ORF	Gène	Echantillon			Choc Ethanol	CER
		3	5	6	(Alexandre <i>et al.</i> 2001)	(Causton <i>et al.</i> 2001)
YGR008C	STF2	+++	++++	++++	+++	+++
YPL057C	SUR1		+			
YJR019C	TES1	+	++	++		
YLR178C	TFS1	+	+	+	++	+++
YPL203W	TPK2	+	++	++	++	+
YDR246W	TRS23		++	+	+	
ML100W	TSL1	+	+		+++	++
YLL039C	UBI4	-	-	-		++
YPL252C	YAH1		+	+		
YNL160W	YGP1	+	+	+	+++	++
YBR101C			+	+		
YER067W		+	++	+		+++
YGR146C			+	+	+	
YJL144W			+++	+++	++	++
YKL151C		+	+		+++	++
YLR327C		+++	++++	++++	+	++++
YMR069W		+	++	++		

\*+ : induit 1,5 à 2,5 fois; ++ : induit 2,5 to 3,5 fois; +++ : > 3,5 fois; +++++, > 7 fois; ++++++ : > 20 fois



# **Références bibliographiques**



1. ADEME/DIREM. (2002) .Bilans énergétiques et gaz à effet de serre des filières de production de biocarburant en France.Rapport
2. Aguilar-Uscanga,B. and François,J.M. (2003a) A study of the yeast cell wall composition and structure in response to growth conditions and mode of cultivation. *Lett. Appl. Microbiol.* **37**, 268-274.
3. Aguilar-Uscanga, B. (2003b). Influence de paramètre de croissance et des conditions de mise en oeuvre sur la composition et l'architecture de la paroi cellulaire de la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse. Thèse de doctorat
4. Aguilera,A. and Benitez,T. (1985) Role of mitochondria in ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Microbiol* **142**, 389-392.
5. Aguilera,F., Peinado,R.A., Millan,C., Ortega,J.M. and Mauricio,J.C. (2006) Relationship between ethanol tolerance, H(+)-ATPase activity and the lipid composition of the plasma membrane in different wine yeast strains. *Int. J Food Microbiol* **110**, 34-42.
6. Aldiguiet,A.S., Alfenore,S., Cameleyre,X., Goma,G., Uribelarrea,J.L., Guillouet,S.E. and Molina-Jouve,C. (2004) Synergistic temperature and ethanol effect on *Saccharomyces cerevisiae* dynamic behaviour in ethanol bio-fuel production. *Bioprocess. Biosyst. Eng* **26**, 217-222.
7. Alexandre,H., Ansanay-Galeote,V., Dequin,S. and Blondin,B. (2001) Global gene expression during short-term ethanol stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* **498**, 98-103.
8. Alexandre,H., Mathieu,B. and Charpentier,C. (1996) Alteration in membrane fluidity and lipid composition, and modulation of H<sup>+</sup>-ATPase activity in *Saccharomyces cerevisiae* caused by decanoic acid. *Microbiology* **142**, 469-475.
9. Alexandre,H., Plourde,L., Charpentier,C. and François,J. (1998) Lack of correlation between trehalose accumulation, cell viability and intracellular acidification as induced by various stresses in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* **144** ( Pt 4), 1103-1111.
10. Alexandre,H., Rousseaux,I. and Charpentier,C. (1994a) Ethanol adaptation mechanisms in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **20** ( Pt 2), 173-183.
11. Alexandre,H., Rousseaux,I. and Charpentier,C. (1994b) Relationship between ethanol tolerance, lipid composition and plasma membrane fluidity in *Saccharomyces cerevisiae* and *Kloeckera apiculata*. *FEMS Microbiol. Lett.* **124**, 17-22.
12. Alfenore,S., Cameleyre,X., Benbadis,L., Bideaux,C., Uribelarrea,J.L., Goma,G., Molina-Jouve,C. and Guillouet,S.E. (2004) Aeration strategy: a need for very high ethanol performance in *Saccharomyces cerevisiae* fed-batch process. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **63**, 537-542.
13. Alfenore,S., Molina-Jouve,C., Guillouet,S.E., Uribelarrea,J.L., Goma,G. and Benbadis,L. (2002) Improving ethanol production and viability of *Saccharomyces cerevisiae* by a vitamin feeding strategy during fed-batch process. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **60**, 67-72.

14. Aries,V. and Kirsop,B.H. (1977) Sterol biosynthesis in relation to growth and fermentation by brewing yeasts inoculated at different concentrations. *J. Inst. Brew.* **83**, 220-223.
15. Aries,V. and Kirsop,B.H. (1978) Sterol biosynthesis by strains of *Saccharomyces cerevisiae* in the presence and absence of dissolved oxygen. *J. Inst. Brew.* **84**, 118-122.
16. Arneborg,N., Moos,M.K. and Jakobsen,M. (1997) Induction of acetic acid tolerance and trehalose accumulation by added and produced ethanol in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Lett.* **19**, 931-933.
17. Arnold, W. N. (1980) lipids. In *Yeast cell envelopes : Biochemistry, biophysics, and ultrastructure : volume I* ed. Arnold,W.N. pp. 97-114. CRC Press.
18. Arnold, W. N. (1981) Autolysis. In *Yeast cell envelopes: biochemistry, biophysics, and ultrastructure : volume II* ed. Arnold,W.N. pp. 129-137. CRC press.
19. Balke,V.L. and Gralla,J.D. (1987) Changes in the linking number of supercoiled DNA accompany growth transitions in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **169**, 4499-4506.
20. Baudet, E. Etude du comportement de diverses souches de *Saccharomyces cerevisiae* lors de fermentations alcooliques en milieu non limitant. 1990. Rapport DEA
21. Bayrock,D.P. and Michael,I.W. (2001) Application of multistage continuous fermentation for production of fuel alcohol by very-high-gravity fermentation technology. *J Ind Microbiol Biotechnol.* **27**, 87-93.
22. Beavan,M.J., Charpentier,C. and Rose,A.H. (1982) Production and tolerance of ethanol in relation to phospholipid fatty-acyl composition in *Saccharomyces cerevisiae* NCYC 431. *J Gen Microbiol* **128**, 1447-1455.
23. Ben Chaabane,F., Aldiguiet,A.S., Alfenore,S., Cameleyre,X., Blanc,P., Bideaux,C., Guillouet,S.E., Roux,G. and Molina-Jouve,C. (2006) Very high ethanol productivity in an innovative continuous two-stage bioreactor with cell recycle. *Bioprocess Biosyst. Eng* **29**, 49-57.
24. Beney,L. and Gervais,P. (2001) Influence of the fluidity of the membrane on the response of microorganisms to environmental stresses. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **57**, 34-42.
25. Birch,R.M. and Walker,G.M. (2000) Influence of magnesium ions on heat shock and ethanol stress responses of *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme Microb. Technol.* **26**, 678-687.
26. Bligh,E.G. and Dyer,W.J. (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* **37**, 911-917.
27. Blomberg,A. (2000) Metabolic surprises in *Saccharomyces cerevisiae* during adaptation to saline conditions: questions, some answers and a model. *FEMS Microbiol Lett.* **182**, 1-8.
28. Bonora,A. and Mares,D. (1982) A simple colorimetric method for detecting cell viability in culture of eukaryotic microorganisms. *Current Microbiology* **7**, 217-221.



29. Bothast,R.J. and Schlicher,M.A. (2005) Biotechnological processes for conversion of corn into ethanol. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **67**, 19-25.
30. Bottema,C.D., Rodriguez,R.J. and Parks,L.W. (1985) Influence of sterol structure on yeast plasma membrane properties. *Biochim. Biophys. Acta* **813**, 313-320.
31. buchholz,S.E., Dooley,M.M. and Eveleigh,D.E. (1987) Zymomonas-an alcoholic enigma. *Trends Biotechnol.* **5**, 199-204.
32. Cardoso,H. and Leao,C. (1992) Sequential inactivation of ammonium and glucose transport in *Saccharomyces cerevisiae* during fermentation. *FEMS Microbiol. Lett.* **73**, 155-159.
33. Carlson,M. (1999) Glucose repression in yeast. *Curr. Opin. Microbiol.* **2**, 202-207.
34. Cartwright,C.P., Veazey,F.J. and Rose,A.H. (1987) Effect of ethanol on activity of the plasma-membrane ATPase in, and accumulation of glycine by, *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Microbiol.* **133**, 857-865.
35. Casey,G.P. and Ingledew,W.M. (1986) Ethanol tolerance in yeasts. *Crit. Rev. Microbiol.* **13**, 219-280.
36. Causton,H.C., Ren,B., Koh,S.S., Harbison,C.T., Kanin,E., Jennings,E.G., Lee,T.I., True,H.L., Lander,E.S. and Young,R.A. (2001) Remodeling of yeast genome expression in response to environmental changes. *Mol. Biol. Cell.* **12**, 323-337.
37. Chatterjee,M.T., Khalawan,S.A. and Curran,B.P. (2000) Cellular lipid composition influences stress activation of the yeast general stress response element (STRE). *Microbiology* **146** ( Pt 4), 877-884.
38. Chi,Z. and Arneborg,N. (1999) Relationship between lipid composition, frequency of ethanol-induced respiratory deficient mutants, and ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Appl. Microbiol* **86**, 1047-1052.
39. Chung,J.H., Lester,R.L. and Dickson,R.C. (2003) Sphingolipid requirement for generation of a functional V1 component of the vacuolar ATPase. *J. Biol. Chem.* **278**, 28872-28881.
40. Clark,D.P. and Beard,J.P. (1979) Altered phospholipid composition in mutants of *Escherichia coli* sensitive or resistant to organic solvents. *J. Gen. Microbiol.* **113**, 267-264.
41. Coelho, S. T. Biofuels-Advances and trade barriers. United Nation Conference on Trade and Development. 2005. Conférence.
42. Conrad,M.J. and Singer,S.J. (1981) The solubility of amphipathic molecules in biological membranes and lipid bilayers and its implications for membrane structure. *Biochemistry* **20**, 808-818.
43. Cooke,D.J. and Burden,R.S. (1990) lipid modulation of the plasma-membrane-bound ATPases. *Physiol. Plant.* **78**, 153-159.

44. Costa,V., Amorim,M.A., Reis,E., Quintanilha,A. and Moradas-Ferreira,P. (1997) Mitochondrial superoxide dismutase is essential for ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* in the post-diauxic phase. *Microbiology* **143** ( Pt 5), 1649-1656.
45. Costa,V., Reis,E., Quintanilha,A. and Moradas-Ferreira,P. (1993) Acquisition of ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*: the key role of the mitochondrial superoxide dismutase. *Arch. Biochem. Biophys.* **300**, 608-614.
46. Coutinho,C., Bernardes,E., Felix,D. and Panek,A.D. (1988) Trehalose as cryoprotectant for preservation of yeast strains. *J. Biotechnol.* **7**, 23-32.
47. Crowe,J.H. and Crowe,L.M. (1984) Preservation of membranes in anhydrobiotic organisms: the role of trehalose. *Science* **223**, 701-703.
48. Cysewski,G.R. and Wilke,C.R. (1978) Process design and economic studies of alternative fermentation methods for the production of ethanol. *Biotechnol. Bioeng.* **20**, 1421-1444.
49. D'Amore,T., Panchal,C.J., Russell,I. and Stewart,G.G. (1990) A study of ethanol tolerance in yeast. *Crit. Rev. Biotechnol.* **9**, 287-304.
50. D'Amore,T., Panchal,C.J. and Stewart,G.G. (1988) Intracellular ethanol accumulation in *Saccharomyces cerevisiae* during fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**, 110-114.
51. D'Amore,T. and Stewart,G.G. (1987) Ethanol tolerance of yeast. *Enzyme Microb. Technol.* **9**, 322-330.
52. Dallies,N., François,J. and Paquet,V. (1998) A new method for quantitative determination of polysaccharides in the yeast cell wall. Application to the cell wall defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **14**, 1297-1306.
53. Daran-Lapujade,P., Jansen,M.L., Daran,J.M., van Gulik,W., de Winde,J.H. and Pronk,J.T. (2004) Role of transcriptional regulation in controlling fluxes in central carbon metabolism of *Saccharomyces cerevisiae*. A chemostat culture study. *J. Biol. Chem.* **279**, 9125-9138.
54. Daum,G., Lees,N.D., Bard,M. and Dickson,R. (1998) Biochemistry, cell biology and molecular biology of lipids of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **14**, 1471-1510.
55. de Virgilio,C., Piper,P., Boller,T. and Wiemken,A. (1991) Acquisition of thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae* without heat shock protein hsp 104 and in the absence of protein synthesis. *FEBS Lett.* **288**, 86-90.
56. Deanda,K., Zhang,M., Eddy,C. and Picataggio,S. (1996) Development of an arabinose-fermenting *Zymomonas mobilis* strain by metabolic pathway engineering. *Appl. Environ. Microbiol* **62**, 4465-4470.
57. Del Castillo Agudo,L. (1992) Lipid content of *Saccharomyces cerevisiae* strains with different degrees of ethanol tolerance. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **37**, 647-651.
58. del Rosario,E.J., Lee,K.H. and Rogers,P.L. (1979) Kinetics of alcohol fermentation at high yeast levels. *Biotechnol. Bioeng.* **21**, 1477-1482.

59. Dellweg, H. (1983) Biotechnology : Biomass, microorganisms for special applications, microbial products I, energy from renewable resources. In *Biotechnology : Biomass, microorganisms for special applications, microbial products I, energy from renewable resources* ed. Rehm,J.H. and Reed,G. pp. 270-280. Verlag Chemie.
60. Delom,F., Szponarski,W., Sommerer,N., Boyer,J.C., Bruneau,J.M., Rossignol,M. and Gibrat,R. (2006) The plasma membrane proteome of *Saccharomyces cerevisiae* and its response to the antifungal calcofluor. *Proteomics*. **6**, 3029-3039.
61. Devantier,R., Pedersen,S. and Olsson,L. (2005a) Transcription analysis of *S. cerevisiae* in VHG fermentation. *Industrial biotechnology* **1**, 51-63.
62. Devantier,R., Scheithauer,B., Villas-Boas,S.G., Pedersen,S. and Olsson,L. (2005b) Metabolite profiling for analysis of yeast stress response during very high gravity ethanol fermentations. *Biotechnol. Bioeng.* **90**, 703-714.
63. Dickson,R.C., Sumanasekera,C. and Lester,R.L. (2006) Functions and metabolism of sphingolipids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Prog. Lipid Res.* **45**(6):447-65
64. Dickson,R.C. and Lester,R.L. (2002) Sphingolipid functions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta* **1583**, 13-25.
65. Dickson,R.C., Nagiec,E.E., Skrzypek,M., Tillman,P., Wells,G.B. and Lester,R.L. (1997) Sphingolipids are potential heat stress signals in *Saccharomyces*. *J. Biol. Chem.* **272**, 30196-30200.
66. Dombek,K.M. and Ingram,L.O. (1984) Effects of ethanol on the *Escherichia coli* plasma membrane. *J. Bacteriol.* **157**, 233-239.
67. Dombek,K.M. and Ingram,L.O. (1986) Determination of the intracellular concentration of ethanol in *Saccharomyces cerevisiae* during fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* **51**, 197-200.
68. Dombek,K.M. and Ingram,L.O. (1987) Ethanol production during batch fermentation with *Saccharomyces cerevisiae*: changes in glycolytic enzymes and internal pH. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**, 1286-1291.
69. Dorman,C.J., Bhriain,N.N. and Higgins,C.F. (1990) DNA supercoiling and environmental regulation of virulence gene expression in *Shigella flexneri*. *Nature* **344**, 789-792.
70. Dubois,M., Gilles,K., Hamilton,J.K., Rebers,P.A. and Smith,F. (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry* **28**, 350-356.
71. Dufour,J.P. and Goffeau,A. (1980) Phospholipid reactivation of the purified plasma membrane ATPase of yeast. *J Biol. Chem.* **255**, 10591-10598.
72. Duntze,W., Atzpodien,W. and Holzer,H. (1967) Glucose-dependent enzyme activities in different yeast species. *Arch. Mikrobiol.* **58**, 296-301.

73. Edgley,M. and Brown,A.D. (1983) Yeast water relations: physiological changes induced by solute stress in *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces rouxii*. *J. Gen. Microbiol.* **129**, 3453-3463.
74. Egli,T. and Fiechter,A. (1981) Theoretical Analysis of Media Used in the Growth of Yeasts on Méthanol. *J. Gen. Microbiol.* **123**, 365-369.
75. Eisen,M.B., Spellman,P.T., Brown,P.O. and Botstein,D. (1998) Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **95**, 14863-14868.
76. Escobar,J.M., Rane,K.D. and Cheryan,M. (2001) Ethanol production in a membrane bioreactor: pilot-scale trials in a corn wet mill. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **91-93**, 283-296.
77. Fankhauser,C., Homans,S.W., Thomas-Oates,J.E., McConville,M.J., Desponds,C., Conzelmann,A. and Ferguson,M.A. (1993) Structures of glycosylphosphatidylinositol membrane anchors from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* **268**, 26365-26374.
78. Felix,C.F., Moreira,C.C., Oliveira,M.S., Sola-Penna,M., Meyer-Fernandes,J.R., Scofano,H.M. and Ferreira-Pereira,A. (1999) Protection against thermal denaturation by trehalose on the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase from yeast. Synergetic effect between trehalose and phospholipid environment. *Eur. J Biochem* **266**, 660-664.
79. Ferreras,J.M., Iglesias,R. and Girbes,T. (1989) Effect of the chronic ethanol action on the activity of the general amino-acid permease from *Saccharomyces cerevisiae* var. ellipsoideus. *Biochim. Biophys. Acta* **979**, 375-377.
80. Folch,J., Lees,M. and Stanley,H.S. (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* **226**, 497-509.
81. François,J. and Parrou,J.L. (2001) Reserve carbohydrates metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Rev.* **25**, 125-145.
82. François,J., Van Schaftingen,E. and Hers,H.G. (1984) The mechanism by which glucose increases fructose 2,6-biphosphate concentration in *Saccharomyces cerevisiae*. A cyclic-AMP-dependent-activation of phosphofructokinase 2. *Eur J Biochem* **145**, 187-193.
83. Frick,O. and Wittmann,C. (2005) Characterization of the metabolic shift between oxidative and fermentative growth in *Saccharomyces cerevisiae* by comparative <sup>13</sup>C flux analysis. *Microb. Cell. Fact.* **4**, 30.
84. Fujita,K., Matsuyama,A., Kobayashi,Y. and Iwahashi,H. (2004) Comprehensive gene expression analysis of the response to straight-chain alcohols in *Saccharomyces cerevisiae* using cDNA microarray. *J. Appl. Microbiol.* **97**, 57-67.
85. Gadd,G.M., Chalmers,K. and Reed,R.H. (1987) The role of trehalose in dehydration resistance of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Lett.* **48**, 249-254.
86. Garcia,J.C. and Kotyk,A. (1988) Effect of ethanol on the specific transport system for L-lysine in *Saccharomyces cerevisiae*. *Folia Microbiol. (Praha)* **33**, 281-284.
87. Garrels,J.I. (1996) YPD-A database for the proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* **24**, 46-49.

88. Gasch,A.P., Spellman,P.T., Kao,C.M., Carmel-Harel,O., Eisen,M.B., Storz,G., Botstein,D. and Brown,P.O. (2000) Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Mol. Biol. Cell.* **11**, 4241-4257.
89. Gasch,A.P. and Werner-Washburne,M. (2002) The genomics of yeast responses to environmental stress and starvation. *Funct. Integr. Genomics* **2**, 181-192.
90. Ghareib,M., Youssef,K.A. and Khalil,A.A. (1988) Ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* and its relationship to lipid content and composition. *Folia Microbiol. (Praha)* **33**, 447-452.
91. Ghosh,R. (1988) <sup>31</sup>P and <sup>2</sup>H NMR studies of structure and motion in bilayers of phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine. *Biochemistry* **27**, 7750-7758.
92. Gille,G., Sigler,K. and Hofer,M. (1993) Response of catalase activity and membrane fluidity of aerobically grown *Schizosaccharomyces pombe* and *Saccharomyces cerevisiae* to aeration and the presence of substrates. *J. Gen. Microbiol.* **139**, 1627-1634.
93. Glazer, A. N. and Nikaido, H. (1993) Ethanol. In *Fundamentals of applied microbiology* pp. 359-391. W.H. Freeman and company.
94. Gonzalez,B., François,J. and Renaud,M. (1997) A rapid and reliable method for metabolite extraction in yeast using boiling buffered ethanol. *Yeast* **13**, 1347-1355.
95. Gornall,A., Bardawill,C. and David,M. (1949) Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J. Biol. Chem.* **177**, 751-766.
96. Gray,J.V., Petsko,G.A., Johnston,G.C., Ringe,D., Singer,R.A. and Werner-Washburne,M. (2004) "Sleeping beauty": quiescence in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **68**, 187-206.
97. Grosz,R. and Stephanopoulos,G. (1990) Physiological, Biochemical, and Mathematical Studies of Micro-Aerobic Continuous Ethanol Fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. I: Hysteresis, Oscillations, and Maximum Specific Ethanol Productivities in Chemostat Culture. *Biotechnol. Bioeng.* **36**, 1006-1019.
98. Guijarro,J.M. and Lagunas,R. (1984) *Saccharomyces cerevisiae* does not accumulate ethanol against a concentration gradient. *J Bacteriol.* **160**, 874-878.
99. Gunasekaran,P. and Chandra Raj,K. (1999) Ethanol fermentation technology – *Zymomonas mobilis*. *Current Science* **77**, 56-68.
100. Hahn,J.S., Hu,Z., Thiele,D.J. and Iyer,V.R. (2004) Genome-wide analysis of the biology of stress responses through heat shock transcription factor. *Mol. Cell. Biol.* **24**, 5249-5256.
101. Hallsworth,J.E. (1998) Ethanol-induced water stress in yeast. *J. Ferm. Bioeng.* **85**, 125-137.
102. Hayashida,K. and Ohta (1980) effects of phosphatidylcholine or ergosteryl oléate on physiological properties of *Saccharomyces sake*, Agricultural and biological chemistry. *J. Inst. Brew.* **44**, 2561-2567.

103. Hayashida,S. and Ohta,K. (1981) Formation of high concentration of alcohol by various yeasts. *J. Inst. Brew.* **87**, 42-44.
104. Herbert, D., Phipps, P. J. and Strang, R. E. (1971) Chemical analysis of microbial cells. London: Academic press.
105. Herman,P.K. (2002) Stationary phase in yeast. *Curr Opin Microbiol* **5**, 602-607.
106. Hounsa,C.G., Brandt,E.V., Thevelein,J., Hohmann,S. and Prior,B.A. (1998) Role of trehalose in survival of *Saccharomyces cerevisiae* under osmotic stress. *Microbiology* **144** (3), 671-680.
107. Ibeas,J.I. and Jimenez,J. (1997) Mitochondrial DNA loss caused by ethanol in *Saccharomyces* flor yeasts. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 7-12.
108. Ingram,L.O. (1977) Preferential inhibition of phosphatidyl ethanolamine synthesis in *E. coli* by alcohols. *Can. J Microbiol.* **23**, 779-789.
109. Ingram,L.O. and Buttke,T.M. (1984) Effects of alcohols on micro-organisms. *Adv. Microb. Physiol.* **25**, 253-300.
110. Ingram,L.O., Gomez,P.F., Lai,X., Moniruzzaman,M., Wood,B.E., Yomano,L.P. and York,S.W. (1998) Metabolic engineering of bacteria for ethanol production. *Biotechnol. Bioeng.* **58**, 204-214.
111. Inoue,T., Iefuji,H., Fujii,T., Soga,H. and Satoh,K. (2000) Cloning and characterization of a gene complementing the mutation of an ethanol-sensitive mutant of sake yeast. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **64**, 229-236.
112. Iwahashi,H., Obuchi,K., Fujii,S. and Komatsu,Y. (1995) The correlative evidence suggesting that trehalose stabilizes membrane structure in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Mol. Biol.* **41**, 763-769.
113. James,T.C., Campbell,S., Donnelly,D. and Bond,U. (2003) Transcription profile of brewery yeast under fermentation conditions. *J. Appl. Microbiol.* **94**, 432-448.
114. Jeffries,T.W. (2006) Engineering yeasts for xylose metabolism. *Curr. Opin. Biotechnol.* **17**, 320-326.
115. Jeffries,T.W. and Jin,Y.S. (2004) Metabolic engineering for improved fermentation of pentoses by yeasts. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **63**, 495-509.
116. Jimenez,J. and Benitez,T. (1987) Adaptation of Yeast Cell Membranes to Ethanol. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**, 1196-1198.
117. Jiménez,J. and van Uden,N. (1985) Use of extracellular acidification for the rapid testing of ethanol tolerance in yeasts. *Biotechnology and Bioengineering* **27**, 1596-1598.
118. Johannsson,A., Keightley,C.A., Smith,G.A., Richards,C.D., Hesketh,T.R. and Metcalfe,J.C. (1981a) The effect of bilayer thickness and n-alkanes on the activity of the (Ca<sup>2+</sup> + Mg<sup>2+</sup>)-dependent ATPase of sarcoplasmic reticulum. *J Biol. Chem.* **256**, 1643-1650.

119. Johannsson,A., Smith,G.A. and Metcalfe,J.C. (1981b) The effect of bilayer thickness on the activity of (Na<sup>+</sup> + K<sup>+</sup>)-ATPase. *Biochim. Biophys. Acta* **641**, 416-421.
120. Jones,R.P. (1987a) Factors influencing deactivation of yeast cells exposed to ethanol. *J. Appl. Bacteriol.* **63**, 153-164.
121. Jones,R.P. (1987b) Measures of yeast death and deactivation and their meaning part I. *Process Biochem* 118-128.
122. Jones,R.P. and Greenfield,P.F. (1987) Ethanol and the fluidity of the yeast plasma membrane. *Yeast* **3**, 223-232.
123. Jones,R.P., Pamment,N. and Greenfield,P.F. (1981) Alcohol fermentation by yeasts-the effect of environmental and other variables. *Process biochemistry* **16**, 42-49.
124. Jules,M., Guillou,V., François,J. and Parrou,J.L. (2004) Two distinct pathways for trehalose assimilation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol* **70**, 2771-2778.
125. Kajiwar,S., Aritomi,T., Suga,K., Ohtaguchi,K. and Kobayashi,O. (2000) Overexpression of the OLE1 gene enhances ethanol fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **53**, 568-574.
126. Kalmokoff,M.L. and Ingledew,W.M. (1985) Evolution of ethanol tolerance in selected *Saccharomyces* Strains. *Am. SOC. Brew. Chem.* **43**, 189-196.
127. Kappeli,O. (1986) Regulation of carbon metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* and related yeasts. *Adv. Microb. Physiol* **28**, 181-209.
128. kockova-kratochvilova, A. (1990) VCH publishers.
129. Kollar,R., Sturdik,E. and Sablaturova,E. (1993a) Biochemical, morphological and cytochemical studies of enhanced autolysis of *Saccharomyces cerevisiae*. 1. Biochemical studies. *Folia Microbiol (Praha)* **38**, 473-478.
130. Kollar,R., Vorisek,J. and Sturdik,E. (1993b) Biochemical, morphological and cytochemical studies of enhanced autolysis of *Saccharomyces cerevisiae*. 2. Morphological and cytochemical studies. *Folia Microbiol (Praha)* **38**, 479-485.
131. Kopp,M., Muller,H. and Holzer,H. (1993) Molecular analysis of the neutral trehalase gene from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **268**, 4766-4774.
132. Kosaric, N. and Vardar-Sukan, F. (2001a) Fermentation modes of indutrial interest. In *The biotechnology of ethanol* ed. Roehr,M. pp. 139-149. Weinheim (Germany): Wiley-VCH.
133. Kosaric, N. and Vardar-Sukan, F. (2001b) Lignocellulose. In *The biotechnology of ethanol* ed. Roehr,M. pp. 125-138. Weinheim (Germany): Wiley-VCH.
134. Kosaric, N. and Vardar-Sukan, F. (2001c) Microbiology and biochemistry of ethanol formation. In *The biotechnology of ethanol* ed. Roehr,M. pp. 89-107. Weinheim (Germany): Wiley-VCH.

135. Koukkou,A.I., Tsoukatos,D. and Drinas,C. (1993) Effect of ethanol on the sterols of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *FEMS Microbiol Lett.* **111**, 171-175.
136. Koukkou,A.I., Tsoukatos,D. and Drinas,C. (1990) Effect of ethanol on the phospholipid and fatty acid content of *Schizosaccharomyces pombe* membranes. *J Gen Microbiol* **136**, 1271-1277.
137. Kubota,S., Takeo,I., Kume,K., Kanai,M., Shitamukai,A., Mizunuma,M., Miyakawa,T., Shimoi,H., Iefuji,H. and Hirata,D. (2004) Effect of ethanol on cell growth of budding yeast: genes that are important for cell growth in the presence of ethanol. *Biosci. Biotechnol. Biochem* **68**, 968-972.
138. Kucsera,J., Yarita,K. and Takeo,K. (2000) Simple detection method for distinguishing dead and living yeast colonies. *J. Microbiol. Methods* **41**, 19-21.
139. Kuriyama,H. and Kobayashi,H. (1993) Effects of oxygen supply on yeast growth and metabolism in continuous fermentation. *J. Ferm. Bioeng.* **75**, 364-367.
140. Lange,H.C. and Heijnen,J.J. (2001) Statistical reconciliation of the elemental and molecular biomass composition of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Bioeng.* **75**, 334-344.
141. Le Berre,V., Trevisiol,E., Dagkessamanskaia,A., Sokol,S., Caminade,A.M., Majoral,J.P., Meunier,B. and François,J. (2003) Dendrimeric coating of glass slides for sensitive DNA microarrays analysis. *Nucleic Acids research* **31**, e88.
142. Leao,C. and van Uden,N. (1982) Effects of ethanil and other alkanols on the glucose transport system of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Bioeng.* **24**, 2601-2604.
143. Leao,C. and van Uden,N. (1984) Effects of ethanol and other alkanols on passive proton influx in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta* **774**, 43-48.
144. Leslie,S.B., Israeli,E., Lighthart,B., Crowe,J.H. and Crowe,L.M. (1995) Trehalose and sucrose protect both membranes and proteins in intact bacteria during drying. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 3592-3597.
145. Lewis,J.G., Learmonth,R.P. and Watson,K. (1995) Induction of heat, freezing and salt tolerance by heat and salt shock in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* **141** (3), 687-694.
146. Lillie,S.H. and Pringle,J.R. (1980) Reserve carbohydrate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*: responses to nutrient limitation. *J. Bacteriol.* **143**, 1384-1394.
147. Lu,X., Li,Y., Duan,Z., Shi,Z. and Mao,Z. (2003) A novel, repeated fed-batch, ethanol production system with extremely long term stability achieved by fully recycling fermented supernatants. *Biotechnol. Lett.* **25**, 1819-1826.
148. Maiorella,B.L., Blanch,H.W. and Wilke,C.R. (1983) By-product inhibition effects on ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Bioeng.* **25**, 103-121.
149. Maiorella,B.L., Blanch,H.W. and Wilke,C.R. (1984) Economic evaluation of alternative ethanol fermentation process. *Biotechnol. Bioeng.* **26**, 1003-1025.



150. Mansure,J.J., Panek,A.D., Crowe,L.M. and Crowe,J.H. (1994) Trehalose inhibits ethanol effects on intact yeast cells and liposomes. *Biochim. Biophys. Acta* **1191**, 309-316.
151. Mansure,J.J., Souza,R.C. and Panek,A.D. (1997) Trehalose metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* during alcoholic fermentation. *Biotechnol. Lett.* **19**, 1201-1203.
152. Marks,V.D., van der Merwe,G.K. and van Vuuren,H.J. (2003) Transcriptional profiling of wine yeast in fermenting grape juice: regulatory effect of diammonium phosphate. *FEMS Yeast Res.* **3**, 269-287.
153. Martinez-Pastor,M.T., Marchler,G., Schuller,C., Marchler-Bauer,A., Ruis,H. and Estruch,F. (1996) The *Saccharomyces cerevisiae* zinc finger proteins Msn2p and Msn4p are required for transcriptional induction through the stress response element (STRE). *EMBO J.* **15**, 2227-2235.
154. Millar,D.G., Griffiths-Smith,K., Algar,E. and Scopes,R.K. (1982) Activity and stability of glycolytic enzymes in the presence of ethanol. *Biotechnol. Lett.* **4**, 601-606.
155. Millard,P.J., Roth,B.L., Thi,H.P., Yue,S.T. and Haugland,R.P. (1997) Development of the FUN-1 family of fluorescent probes for vacuole labeling and viability testing of yeasts. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 2897-2905.
156. Mishra,P. and Prasad,R. (1988) Role of phospholipid head groups in ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Microbiol.* **134**, 3205-3211.
157. Mishra,P. and Prasad,R. (1989) Relationship between fluidity and L-alanine transport in a fatty acid auxotroph of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Int.* **19**, 1019-1030.
158. Molano,J., Duran,A. and Cabib,E. (1977) A rapid and sensitive assay for chitinase using tritiated chitin. *Anal. Biochem.* **83**, 648-656.
159. Monteiro,G.A., Supply,P., Goffeau,A. and Sa-Correia,I. (1994) The in vivo activation of *Saccharomyces cerevisiae* plasma membrane H(+)-ATPase by ethanol depends on the expression of the PMA1 gene, but not of the PMA2 gene. *Yeast* **10**, 1439-1446.
160. Nevoigt,E. and Stahl,U. (1997) Osmoregulation and glycerol metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Rev.* **21**, 231-241.
161. Nishino,H., Miyasaki,S. and Tohjo,K. (1985) Effect of Osmotic Pressure on the Growth Rate and Fermentation Activity of Wine Yeasts. *Am. J. Enol. Vitic* **36(2)**, 170-174.
162. Nissen,T.L., Hamann,C.W., Kielland-Brandt,M.C., Nielsen,J. and Villadsen,J. (2000) Anaerobic and aerobic batch cultivations of *Saccharomyces cerevisiae* mutants impaired in glycerol synthesis. *Yeast* **16**, 463-474.
163. Novak,M., Strehaiano,P., Moreno,M. and Goma,G. (1981) Alcoholic fermentation : on the inhibitory effect of ethanol. *Biotechnol. Bioeng.* **23**, 201-211.
164. Novotny,C., Flieger,M., Panos,J. and Karst,F. (1992) Effect of 5,7-unsaturated sterols on ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **15**, 314-320.

165. Nwaka,S., Kopp,M., Burgert,M., Deuchler,I., Kienle,I. and Holzer,H. (1994) Is thermotolerance of yeast dependent on trehalose accumulation? *FEBS Lett.* **344**, 225-228.
166. Odumeru,J.A., D'Amore,T., Russell,I. and Stewart,G.G. (1993) Alterations in fatty acid composition and trehalose concentration of *Saccharomyces* brewing strains in response to heat and ethanol shock. *J. Ind. Microbiol.* **11**, 113-119.
167. Ogawa,Y., Nitta,A., Uchiyama,H., Imamura,T., Shimoi,H. and Ito,K. (2000) Tolerance mechanism of the ethanol- tolerant mutant of sake yeast. *J. Biosc. Bioeng.* **90**, 313-320.
168. Ohtani,M., Saka,A., Sano,F., Ohya,Y. and Morishita,S. (2004) Development of image processing program for yeast cell morphology. *J. Bioinform. Comput. Biol* **1**, 695-709.
169. Olesen,K., Felding,T., Gjermansen,C. and Hansen,J. (2002) The dynamics of the *Saccharomyces carlsbergensis* brewing yeast transcriptome during a production-scale lager beer fermentation. *FEMS Yeast Res.* **2**, 563-573.
170. Oura,E. (1977) Reaction products of yeast fermentations. *Process Biochem.* **12**, 19-21.
171. Oura, E. (1983) Biomass from Carbohydrates. In *Biotechnology : Biomass, microorganisms for special applications, microbial products I, energy from renewable resources (vol.3)* ed. Dellweg,H. pp. 3-43. Verlag Chemie.
172. Parks,L.W. (1978) Metabolism of sterols in yeast. *CRC Crit Rev. Microbiol.* **6**, 301-341.
173. Parrou,J.L., Enjalbert,B., Plourde,L., Bauche,A., Gonzalez,B. and François,J. (1999) Dynamic response of reserve carbohydrate metabolism under carbon and nitrogen limitations in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **15**, 191-203.
174. Parrou,J.L. and François,J. (1997) A simplified procedure for a rapid and reliable assay of both glycogen and trehalose in whole yeast cells. *Anal. Biochem.* **248**, 186-188.
175. Parrou,J.L., Teste,M.A. and François,J. (1997) Effects of various types of stress on the metabolism of reserve carbohydrates in *Saccharomyces cerevisiae*: genetic evidence for a stress-induced recycling of glycogen and trehalose. *Microbiology* **143** (6), 1891-1900.
176. Pascual,C., Alonso,A., Garcia,I. and Romy,C. (1988) Effect of ethanol on glucose transport, key glycolytic enzymes, and proton extrusion in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Bioeng.* **32**, 374-378.
177. Patton,J.L. and Lester,R.L. (1991) The phosphoinositol sphingolipids of *Saccharomyces cerevisiae* are highly localized in the plasma membrane. *J. Bacteriol.* **173**, 3101-3108.
178. Perez-Ortin,J.E., Garcia-Martinez,J. and Alberola,T.M. (2002) DNA chips for yeast biotechnology. The case of wine yeasts. *J. Biotechnol.* **98**, 227-241.
179. Piper,P.W. (1995) The heat shock and ethanol stress responses of yeast exhibit extensive similarity and functional overlap. *FEMS Microbiol. Lett.* **134**, 121-127.

180. Piper,P.W., Ortiz-Calderon,C., Holyoak,C., Coote,P. and Cole,M. (1997) Hsp30, the integral plasma membrane heat shock protein of *Saccharomyces cerevisiae*, is a stress-inducible regulator of plasma membrane H(+)-ATPase. *Cell Stress. Chaperones*. **2**, 12-24.
181. Piper,P.W., Talreja,K., Panaretou,B., Moradas-Ferreira,P., Byrne,K., Praekelt,U.M., Meacock,P., Recnacq,M. and Boucherie,H. (1994) Induction of major heat-shock proteins of *Saccharomyces cerevisiae*, including plasma membrane Hsp30, by ethanol levels above a critical threshold. *Microbiology* **140** (11), 3031-3038.
182. Prenosil, J. E. (1983) Biotechnology : Biomass, microorganisms for special applications, microbial products I, energy from renewable resources. In *Biotechnology : Biomass, microorganisms for special applications, microbial products I, energy from renewable resources (vol.3)* ed. Dellweg,H. pp. 270-280. Verlag Chemie.
183. Pueyo,E., Martinez-Rodriguez,A., Polo,M.C., Santa-Maria,G. and Bartolome,B. (2000) Release of lipids during yeast autolysis in a model wine system. *J Agric. Food Chem.* **48**, 116-122.
184. Rattray, J. B. M. (1988) yeasts. In *Microbial lipids* ed. Ratledge,C. and Wilkinson,S.G. pp. 555-698. Harcourt Brace Jovanovich.
185. REISSIG,J.L., STORMINGER,J.L. and LELOIR,L.F. (1955) A modified colorimetric method for the estimation of N-acetyl amino sugars. *J Biol Chem.* **217**, 959-966.
186. Robinson,M.D., Grigull,J., Mohammad,N. and Hughes,T.R. (2002) FunSpec: a web-based cluster interpreter for yeast. *BMC Bioinformatics* **3**, 35.
187. Ronne,H. (1995) Glucose repression in fungi. *Trends Genet.* **11**, 12-17.
188. Rossignol,T., Dulau,L., Julien,A. and Blondin,B. (2003) Genome-wide monitoring of wine yeast gene expression during alcoholic fermentation. *Yeast* **20**, 1369-1385.
189. Rouser,G., Fkeischer,S. and Yamamoto,A. (1970) Two dimensional thin layer chromatographic separation of polar lipids and determination of phospholipids by phosphorus analysis of spots. *Lipids* **5**, 494-496.
190. Rozès, N. Contribution à l'étude du métabolisme lipidique de *Saccharomyces cerevisiae*. Application à la différenciation des levures du vin. 1992. Université de Bordeaux II U.F.R. d'oenologie. Thèse de doctorat
191. Rozès,N., García-Jares,C., Larue,F. and Lonvaud-Funel,A. (1992) Differentiation between fermenting and spoilage yeasts in wine by total free fatty acid analysis. *J. Sci. Food Agric.* **59**, 357.
192. Ryu,D.D.Y., Kim,Y.J. and Kim,J.H. (1984) Effect of air supplement on the performance of continuous ethanol fermentation system. *Biotechnol. Bioeng.* **26**, 12-16.
193. Sajbidor,J. (1997) Effect of some environmental factors on the content and composition of microbial membrane lipids. *Crit Rev. Biotechnol.* **17**, 87-103.

194. Sajbidor,J., Ciesarova,Z. and Smogrovicova,D. (1995) Influence of ethanol on the lipid content and fatty acid composition of *Saccharomyces cerevisiae*. *Folia Microbiol (Praha)* **40**, 508-510.
195. Salgueiro,S.P., Sa-Correia,I. and Novais,J.M. (1988) Ethanol-induced leakage in *Saccharomyces cerevisiae* : kinetics and relationship to yeast ethanol tolerance and alcohol fermentation productivity. *Appl. Environ. Microbiol* **54**, 903-909.
196. Sandager,L., Gustavsson,M.H., Stahl,U., Dahlqvist,A., Wiberg,E., Banas,A., Lenman,M., Ronne,H. and Stymne,S. (2002) Storage lipid synthesis is non-essential in yeast. *J. Biol. Chem.* **277**, 6478-6482.
197. Shima,J., Kuwazaki,S., Tanaka,F., Watanabe,H., Yamamoto,H., Nakajima,R., Tokashiki,T. and Tamura,H. (2005) Identification of genes whose expressions are enhanced or reduced in baker's yeast during fed-batch culture process using molasses medium by DNA microarray analysis. *Int. J. Food Microbiol.* **102**, 63-71.
198. Slater,S.J., Ho,C., Taddeo,F.J., Kelly,M.B. and Stubbs,C.D. (1993) Contribution of hydrogen bonding to lipid-lipid interactions in membranes and the role of lipid order: effects of cholesterol, increased phospholipid unsaturation, and ethanol. *Biochemistry* **32**, 3714-3721.
199. Sonnleitner,B. and Kappeli,O. (1986) Growth of *Saccharomyces cerevisiae* is controlled by its limited respiratory capacity: Formulation and verification of hypothesis. *Biotechnol. Bioeng.* **28**, 927-937.
200. Stephan,J., Mailaender,C., Etienne,G., Daffe,M. and Niederweis,M. (2004) Multidrug resistance of a porin deletion mutant of *Mycobacterium smegmatis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**, 4163-4170.
201. Suzuki,T., Mori,H., Yamane,T. and Shimizu,S. (1985) Automatic supplementation of minerals in fed-batch culture to high cell mass concentration. *Biotechnol. Bioeng.* **27**, 192-201.
202. Swan,T.M. and Watson,K. (1998) Stress tolerance in a yeast sterol auxotroph: role of ergosterol, heat shock proteins and trehalose. *FEMS Microbiol. Lett.* **169**, 191-197.
203. Takahashi,T., Shimoi,H. and Ito,K. (2001) Identification of genes required for growth under ethanol stress using transposon mutagenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Genet. Genomics* **265**, 1112-1119.
204. Thomas,D.S., Hossack,J.A. and Rose,A.H. (1978) Plasma-membrane lipid composition and ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Microbiol.* **117**, 239-245.
205. Thomas,D.S. and Rose,A.H. (1979) Inhibitory effect of ethanol on growth and solute accumulation by *Saccharomyces cerevisiae* as affected by plasma-membrane lipid composition. *Arch. Microbiol.* **122**, 49-55.
206. Thomas,K.C., Hynes,S.H., Jones,A.M. and Ingledew,W.M. (1993) Production of fuel alcohol from wheat by VHG technology. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **43**, 211-226.

207. Thomson,J.M., Gaucher,E.A., Burgan,M.F., De Kee,D.W., Li,T., Aris,J.P. and Benner,S.A. (2005) Resurrecting ancestral alcohol dehydrogenases from yeast. *Nat. Genet.* **37**, 630-635.
208. van der Rest,M.E., Kamminga,A.H., Nakano,A., Anraku,Y., Poolman,B. and Konings,W.N. (1995) The plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*: structure, function, and biogenesis. *Microbiol. Rev.* **59**, 304-322.
209. van Dijken,J.P. and Scheffers,W.A. (1986) Redox balances in the metabolism of sugars by yeasts. *FEMS Microbiol. Lett.* **32**, 199-224.
210. van Gulik,W. and Heijnen,J.J. (1995) A metabolic network stoichiometry analysis of microbial growth and product formation. *Biotechnol. Bioeng.* **48**, 681-698.
211. van Voorst,F., Houghton-Larsen,J., Jonson,L., Kielland-Brandt,M.C. and Brandt,A. (2006) Genome-wide identification of genes required for growth of *Saccharomyces cerevisiae* under ethanol stress. *Yeast* **23**, 351-359.
212. Ventsislava,Y.P., Tanya,V.R. and Kujumdzieva,A.V. (2002) Catalase enzyme in mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*. *Electronic Journal of Biotechnology* **5**, 30-41.
213. Verduyn,C., Stouthamer,A.H., Scheffers,W.A. and van Dijken,J.P. (1991) A theoretical evaluation of growth yields of yeasts. *Antonie Van Leeuwenhoek* **59**, 49-63.
214. Viegas,C.A., Rosa,M.F., Sa-Correia,I. and Novais,J.M. (1989) Inhibition of Yeast Growth by Octanoic and Decanoic Acids Produced during Ethanolic Fermentation. *Appl. Environ. Microbiol* **55**, 21-28.
215. Walker-Caprioglio,H.M., Casey,W.M. and Parks,L.W. (1990) *Saccharomyces cerevisiae* membrane sterol modifications in response to growth in the presence of ethanol. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 2853-2857.
216. Walther,K. and Schuller,H.J. (2001) Adr1 and Cat8 synergistically activate the glucose-regulated alcohol dehydrogenase gene ADH2 of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* **147**, 2037-2044.
217. Weber,F.J. and de Bont,J.A. (1996) Adaptation mechanisms of microorganisms to the toxic effects of organic solvents on membranes. *Biochim. Biophys. Acta* **1286**, 225-245.
218. Werner-Washburne,M., Braun,E.L., Crawford,M.E. and Peck,V.M. (1996) Stationary phase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* **19**, 1159-1166.
219. Wyman,C.E. (2001) Twenty years of trials, tribulations, and research progress in bioethanol technology: selected key events along the way. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **91**, 5-21.
220. You,K.M., Rosenfield,C.L. and Knipple,D.C. (2003) Ethanol tolerance in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is dependent on cellular oleic acid content. *Appl. Environ. Microbiol* **69**, 1499-1503.
221. Zak,B. (1957) Simple rapid microtechnic for serum total cholesterol. *Am. J. Clin. Pathol.* **27**, 583-588.

222. Zalewski,K. and Buchholz,R. (1996) Morphological analysis of yeast cells using an automated image processing system. *J. Biotechnol.* **48**, 43-49.

223. Zhang,W., Needham,D.L., Coffin,M., Rooker,A., Hurban,P., Tanzer,M.M. and Shuster,J.R. (2003) Microarray analyses of the metabolic response of *Saccharomyces cerevisiae* to organic solvent dimethyl sulfoxide. *J. Indus. Microbiol. Biotechnol.* **30**, 57-69.

## Liste des figures

- Figure 1 :** Schéma regroupant les grandes étapes de l'obtention d'éthanol biocarburant à partir de biomasse végétale (Bothast et Schlicher 2005; Glazer et Nikaido 1993). \_\_\_\_\_ **25**
- Figure 2 :** a) schéma de fonctionnement du BRM (Bi-Réacteur à Membrane),  $\Phi_s$ : flux d'apport du substrat,  $\Phi_p$ : flux de sortie du produit (éthanol) ; b) résultats cinétiques d'une fermentation fed-batch avec l'évolution de la viabilité ( $\square$ ), de la vitesse spécifique de production d'éthanol  $v_p$  (—) et du taux de croissance  $\mu$  (—) en fonction de la concentration en éthanol dans le milieu. \_\_\_\_\_ **31**
- Figure 3 :** Schéma récapitulatif de la voie de production d'éthanol et des voies métaboliques annexes pouvant conduire à la production de sous-produits. \_\_\_\_\_ **35**
- Figure 4 :** Structure des différents phospholipides. \_\_\_\_\_ **44**
- Figure 5 :** Principaux intermédiaires de la voie de synthèse de l'ergostérol. Dans l'ordre de la voie de synthèse, a) acide mévalonique, b) squalène, c) lanostérol, d) zymostérol, e) 5,7,24(28)-ergostatetrienol, f) 5,7,22,24(28)-ergostatetraenol, g) ergostérol. \_\_\_\_\_ **47**
- Figure 6 :** Structures des principaux sphingolipides. (van der Rest *et al.* 1995) \_\_\_\_\_ **48**
- Figure 7 :** Structure des ancres GPI (Glycosylated Phosphatidyl-Inositol) rencontrées pour les protéines de *Saccharomyces cerevisiae* (Fankhauser *et al.* 1993). La partie lipidique est le plus souvent un céramide. Il y a en général quatre mannoses (M1 à M4). M5 est optionnel en  $\alpha(1-2)$  ou  $\alpha(1-3)$ . \_\_\_\_\_ **49**
- Figure 8 :** Relation entre la concentration en alcool qui inhibe de 50% l'activité du transporteur du glucose et le coefficient de partage des alcools entre les membranes et le tampon utilisé pour l'expérience (Leao et van Uden 1982). \_\_\_\_\_ **54**
- Figure 9 :** Schéma récapitulatif du modèle d'action de l'éthanol sur une cellule de levure. \_ **67**
- Figure 10 :** Molécule de bleu de méthylène sous forme oxydée et sous forme réduite. Cette molécule va réagir avec les activités oxydoréductases des cellules encore actives. \_\_\_\_\_ **75**
- Figure 11 :** Molécule de FUN<sup>®</sup> 1. \_\_\_\_\_ **76**
- Figure 12 :** Exemple d'image de microscopie à fond noir obtenue lors d'une culture typique de levure en bioréacteur (120g.l<sup>-1</sup> d'éthanol produit), sur laquelle se superpose l'analyse par le logiciel d'analyse d'image développé par Ohtani *et al.* (2004) et l'identification des différentes formes. \_\_\_\_\_ **77**
- Figure 13 :** Exemple de plaque obtenue après une première migration avec un mélange hexane/MTBE/acide acétique (70:30:0,2, v/v) jusqu'à la moitié de la plaque, puis une deuxième migration avec de l'hexane seul jusqu'à 1 cm du bord de la plaque. Ceci permet de séparer les différents lipides neutres. Les trois premiers dépôts sont des étalons. Les suivants sont des extraits lipidiques de *Saccharomyces cerevisiae* CBS8066. \_\_\_\_\_ **85**

**Figure 14 :** Exemple de migration dans un solvant chloroforme/acétone/méthanol/acide acétique/eau (50 :15 :10 :10 :5, v/v) permettant de séparer les différents phospholipides. Les quatre premiers dépôts sont des étalons. Les suivants sont des extraits lipidiques de *Saccharomyces cerevisiae* CBS8066. \_\_\_\_\_ **86**

**Figure 15 :** Comparaison du signal du dépôt de 1 µg d'acide stéarique (18:0), oléique (18:1), et linoléique (18:2) sur plaque de silice après révélation au sulfate de cuivre (10% w/v dans H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 8% v/v). \_\_\_\_\_ **87**

**Figure 16 :** Schéma récapitulatif de la démarche expérimentale aboutissant à l'estimation de l'erreur expérimentale globale du processus. \_\_\_\_\_ **108**

**Figure 17 :** Schéma descriptif de la méthode n°1 (Rozès 1992). TA = température ambiante, HCCl<sub>3</sub>= chloroforme. \_\_\_\_\_ **115**

**Figure 18 :** Schéma descriptif de la méthode n°2 \_\_\_\_\_ **116**

**Figure 19 :** Schéma descriptif de la méthode n°3. Vm/Vc= (2:1), puis une fois (1:1) et enfin deux fois (1:2). TA= température ambiante, Vm/Vc=volume de méthanol/volume de chloroforme. \_\_\_\_\_ **117**

**Figure 20 :** Schéma descriptif de l'appareillage soxhlet de la méthode n°4. \_\_\_\_\_ **118**

**Figure 21 :** Estimation par gravimétrie du contenu total en lipides, rapporté à la masse sèche (MS) de cellules, après chaque étape d'extraction (E1 à E6) \_\_\_\_\_ **122**

**Figure 22 :** Estimation du contenu en lipides, rapporté à la masse sèche (MS) de cellules, après chaque étape d'extraction (E1 à E6), mesuré par Chromatographie Couche Mince. ERG=ergostérol, AG=acides gras libres, TG=triglycérides, ES=esters de stérol, LAN=lanostérol, PC=phosphatidyl-choline, PE=phosphatidyl-éthanolamine, PI=phosphatidyl-inositol, PS= phosphatidyl-sérine, CL+PA= cardiolipides et acide phosphatidique. \_\_\_\_\_ **123**

**Figure 23 :** Comparaison de l'effet du type de lavage sur l'élimination des acides aminés présents dans l'extrait lipidique. A) Chromatographie couche mince avec butanol/acide acétique/H<sub>2</sub>O (40/20/20) comme solvant de migration et révélation à la ninhydrine. B) Tableau récapitulatif des pourcentages d'élimination des acides aminés après deux lavages soit à l'eau, soit au KCl 0,88% (w/v). \_\_\_\_\_ **125**

**Figure 24 :** Comparaison du pourcentage de lipides extraits ramené à la masse sèche (% MS) de cellules avec ou sans utilisation d'antioxydant (BHT). a) lipides totaux obtenus par gravimétrie ; b) phospholipides totaux (PL totaux) et des stérols totaux obtenus par méthodes colorimétriques ; c) chaque phospholipide (PI=phosphatidylinositol, PC=phosphatidylcholine, PE=phosphatidyléthanolamine, CL+PA=cardiolipides et acide phosphatidique).et d) de chaque lipide neutre (ERG=ergostérol, AG=acides gras libres, TG=triglycérides, ES=esters de stérol) quantifiés par CCM. \_\_\_\_\_ **127**

**Figure 25 :** Schéma récapitulatif de l'étude de la reproductibilité de l'extraction+quantification. \_\_\_\_\_ **128**



**Figure 26 :** Quantités de lipides récupérés après extraction complète en fonction du volume de solution de standards rajouté : a) pour les lipides neutres ; b) pour les phospholipides. SQ=squalène, ES=esters de stérols, TG=triglycérides, AG=acides gras libres, LAN=lanostérol, ERG=ergostérol, PI=phosphatidyl-inositol, PS=phosphatidyl-sérine, PC=phosphatidyl-choline, PE=phosphatidyl-éthanolamine, PG=phosphatidyl-glycérol, CL+PA=cardiolipides et acide phosphatidique. \_\_\_\_\_ **132**

**Figure 27 :** Evolution des concentrations en glucose ( $\text{g.l}^{-1}$ ), biomasse ( $\text{g.l}^{-1}$ ), éthanol ( $\text{g.l}^{-1}$ ) et glycérol ( $\text{g.l}^{-1}$ ) en fonction du temps de fermentation pour les quatre fermentations 1 à 4. Les conditions de ces quatre fermentations sont identiques à l'exception de l'apport de glucose \_\_\_\_\_ **139**

**Figure 28 :** Evolution de la vitesse spécifique de production d'éthanol  $v_p$  (—) et du taux de croissance  $\mu$  (—) en fonction de la concentration en éthanol dans le milieu pour les quatre fermentations 1 à 4. Les conditions de ces quatre fermentations sont identiques à l'exception de l'apport de glucose \_\_\_\_\_ **140**

**Figure 29 :** Exemple de coloration au bleu de méthylène. La photo a été prise lors d'une fermentation alcoolique, avec  $116 \text{ g.l}^{-1}$  d'éthanol. \_\_\_\_\_ **146**

**Figure 30 :** Exemple de coloration au FUN<sup>®</sup> 1. La photo a été prise lors d'une fermentation alcoolique, avec  $116 \text{ g.l}^{-1}$  d'éthanol. \_\_\_\_\_ **146**

**Figure 31 :** Evolution de la proportion de cellules non colorées par bleu de méthylène ( $\%$ ) et de la proportion de cellules présentant des CIVS après coloration au FUN<sup>®</sup> 1 ( $\%$ ) au cours d'une fermentation alcoolique. \_\_\_\_\_ **147**

**Figure 32 :** Evolution de la proportion de cellules non colorées par le bleu de méthylène en fonction de la concentration en éthanol, pour chacune des quatre fermentations 1 à 4 : \_\_\_\_ **149**

**Figure 33 :** Exemple de photos prises à l'aide d'un microscope à fond noir (Olympus BH2, objectif 40X, DplanApo40UVPL) équipé d'une caméra CCD (DXM 1200, Nikon). Photo prise pendant la fermentation 3. Lors de la prise de la photo la concentration dans le réacteur était de  $118 \text{ g.l}^{-1}$ . \_\_\_\_\_ **150**

**Figure 34 :** Evolution, en fonction de la production d'éthanol au cours de la fermentation, du taux de croissance  $\mu$  (—), de la vitesse spécifique de production d'éthanol  $v_p$  (—), de la proportion relative de cellules non colorées au bleu de méthylène ( $\%$ ) et de la proportion relative de cellules sombres ( $\%$ ). \_\_\_\_\_ **152**

**Figure 35 :** Evolution des pourcentages de petites ( $\%$ ), moyennes ( $\%$ ) et grosses ( $\%$ ) cellules pour chaque catégorie de cellules en fonction de leur brillance pour les prélèvements n°1 à 7 (1 :  $25,6 \text{ g.l}^{-1}$  d'éthanol ; 2 :  $54,3 \text{ g.l}^{-1}$  d'éthanol ; 3 :  $75,4 \text{ g.l}^{-1}$  d'éthanol ; 4 :  $114 \text{ g.l}^{-1}$  d'éthanol ; 5 :  $120 \text{ g.l}^{-1}$  d'éthanol ; 6 :  $118 \text{ g.l}^{-1}$  d'éthanol ; 7 :  $120 \text{ g.l}^{-1}$  d'éthanol) (cf. figure 34). a) cellules non bourgeonnantes sombres ; b) cellules non bourgeonnantes brillantes ; c) cellules bourgeonnantes sombres ; d) cellules bourgeonnantes brillantes ; e) bourgeons sombres ; f) bourgeons brillants. ----- : arrêt de croissance qui sépare la phase de croissance de la phase de découplage. \_\_\_\_\_ **154**

**Figure 36 :** Evolution du taux de croissance  $\mu$  (—), de la vitesse spécifique de production d'éthanol  $v_p$  (—), de la viabilité relative de cellules au bleu de méthylène ( $\cup$ ) et des composants macromoléculaires en pourcentage de la masse sèche (% MS) en fonction de la concentration en éthanol : protéines ( $\pounds$ ), carbohydrates ( $\pounds$ ), ADN/ARN ( $\pounds$ ), lipides ( $\boxtimes$ ). Le reste pour faire une somme de 100% est assimilé aux cendres ( $\pounds$ ). \_\_\_\_\_ **157**

**Figure 37 :** Evolution du taux de croissance  $\mu$  (—), de la vitesse spécifique de production d'éthanol  $v_p$  (—) et de la viabilité mesurée par coloration au bleu de méthylène ( $\bullet \bullet - \bullet \bullet$ ) en fonction de la concentration en éthanol. \_\_\_\_\_ **164**

**Figure 38 :** Schéma expérimental de la stratégie adoptée pour le marquage et l'hybridation des six échantillons (1 à 6). \_\_\_\_\_ **165**

**Figure 39 :** Courbes : évolution du taux de croissance  $\mu$  (—), de la vitesse spécifique de production d'éthanol  $v_p$  (—) et de la viabilité mesurée (— - —) au bleu de méthylène en fonction de la concentration en éthanol. Histogrammes : représentation du nombre de gènes sur-exprimés ( $\cap$ ) et du nombre de gènes sous-exprimés ( $\cap$ ), en fonction de la concentration en éthanol. \_\_\_\_\_ **167**

**Figure 40 :** Dendrogramme du cluster hiérarchique sur les prélèvements de la fermentation (prélèvements 2, 3, 4, 5 et 6 par rapport à la référence 1, cf. figures 37 et 38) effectué avec l'ensemble des ratios d'expression. \_\_\_\_\_ **168**

**Figure 41 :** Profil n°1 et n°2 des changements globaux d'expression en fonction de la concentration en éthanol par clustering de type SOM. \_\_\_\_\_ **169**

**Figure 42 :** Répartition dans les différentes catégories fonctionnelles du nombre A.) de gènes sur-exprimés ( $P < 0,05$  et  $\text{Ratio} > 1,8$ ) et B.) de gènes sous-exprimés ( $P < 0,05$  et  $\text{Ratio} < 0,55$ ) en fonction du temps de fermentation (2, 3, 4, 5 ou 6 par rapport au temps de référence 1). Sur la droite, est indiqué le pourcentage maximal que ces nombres représentent à l'intérieur de la famille. \_\_\_\_\_ **171**

**Figure 43 :** Gènes cibles des facteurs de transcription (a) (Heat Shock Factor) HSF et (b) Msn2/Msn4 induits dans nos conditions. Les cibles HSF et Msn2/Msn4p sont classées selon leur fonction connue ou hypothétique en se basant sur la base YPD. \_\_\_\_\_ **177**

**Figure 44 :** a) Taux de croissance  $\mu$  (—), vitesse spécifique de production d'éthanol  $v_p$  (—), viabilité cellulaire mesurée au bleu de méthylène ( $\textcircled{R}$ ) et accumulation des réserves intracellulaires en tréhalose ( $\text{TM}$ ) et en glycogène ( $\text{r}$ ) exprimées en pourcentage de la masse sèche (% MS) en fonction de la concentration en éthanol dans le milieu pour la fermentation n°1. Référence (1), 2, 3, 4, 5 et 6 correspondent aux échantillons d'ARN pour l'analyse des profils d'expression des gènes. b) schéma de synthèse et dégradation des réserves. \_\_\_\_\_ **180**

**Figure 45 :** Evolution, en fonction de la concentration en éthanol, du taux de croissance  $\mu$  (—), de la vitesse spécifique de production d'éthanol  $v_p$  (—), de la viabilité ( $\zeta$ ) ; des contenus intracellulaires rapportés à la masse sèche (% MS) de cellules en hexose-6-phosphate (glucose-6-phosphate+ fructose-6-phosphate) (--- $\hat{=}$ ---) et en fructose-1-6-phosphate (— $\hat{=}$ —) pour les fermentations 3 et 4. - - - - : arrêt de la croissance séparant la phase de croissance de la phase de découplage \_\_\_\_\_ **195**

**Figure 46 :** Evolution de la viabilité ( $\cup$ ) et du contenu intracellulaire rapportés à la masse sèche (MS) de cellules du pool de nucléotides (ATP+ADP+AMP) ( $^{TM}$ ) pendant les fermentations 3 et 4, en fonction de la concentration en éthanol. - - - - : arrêt de la croissance séparant la phase de croissance de la phase de découplage. \_\_\_\_\_ **197**

**Figure 47 :** Evolution, en fonction de la concentration en éthanol, de la viabilité cellulaire ( $^{\circ}$ ), du pool de nucléotides extracellulaires (ATP+ADP+AMP) ( $^{TM}$ ) et du glucose-6-phosphate ( $\Gamma$ ) extracellulaire pendant les fermentations 3 et 4. - - - - : arrêt de la croissance séparant la phase de croissance de la phase de découplage. \_\_\_\_\_ **199**

**Figure 48 :** Evolution, en fonction de la concentration en éthanol, du taux de croissance  $\mu$  (—), de la vitesse spécifique de production d'éthanol  $v_p$  (—), de la viabilité ( $\zeta$ ) ; des contenus intracellulaires rapportés à la masse sèche (% MS) de cellules en tréhalose ( $^{TM}$ ) et glycogène ( $\hat{e}$ ) ; et en tréhalose-6-P ( $^-$ ), glucose-6-P ( $\sim$ ) et UDP-glucose ( $\rho$ ), pour les fermentations 3 et 4. - - - - : arrêt de la croissance séparant la phase de croissance de la phase de découplage. \_\_\_\_\_ **201**

**Figure 49 :** Evolution, en fonction de la concentration en éthanol, du taux de croissance  $\mu$  (—), de la vitesse spécifique de production d'éthanol  $v_p$  (—), de la viabilité ( $\zeta$ ), du contenu intracellulaire en stérols totaux (somme des différents stérols séparés par CCM) ( $\sim$ ), ramené à la masse sèche (% MS) de cellules, et de la répartition en lanostérol, ergostérol et esters de stérol dans les stérols totaux. ----- : arrêt de croissance séparant la phase de croissance de la phase de découplage. \_\_\_\_\_ **205**

**Figure 50 :** Evolution, en fonction de la concentration en éthanol, du taux de croissance  $\mu$  (—), de la vitesse spécifique de production d'éthanol  $v_p$  (—), de la viabilité au bleu de méthylène ( $\zeta$ ), du contenu intracellulaire en phospholipides totaux ( $\Phi$ ), ramené à la masse sèche (% MS) de cellules, et de la répartition en Phosphatidyl-éтанолamine (PE), Phosphatidyl-inositol (PI), Phosphatidyl-choline (PC), Cardiolipide et Acide Phosphatidique (CL+PA) dans les phospholipides totaux. ----- : arrêt de croissance séparant la phase de croissance de la phase de découplage. \_\_\_\_\_ **207**

**Figure 51 :** Corrélation entre le contenu intracellulaire en phospholipides, rapporté à la masse sèche (% MS) de cellules, et la viabilité cellulaire relative mesurée au bleu de méthylène pour les fermentations 3 ( $\sim$ ) et 4 ( $\zeta$ ) ( $R^2=0,9$ ). \_\_\_\_\_ **208**

**Figure 52 :** Evolution, en fonction de la concentration en éthanol, du taux de croissance  $\mu$  (—), de la vitesse spécifique de production d'éthanol  $v_p$  (—), de la viabilité ( $\zeta$ ), du contenu intracellulaire en triglycérides ( $\Gamma\rho\Gamma$ ), acides gras libres ( $^{TM}$ ) et esters d'acides gras ( $\rightarrow$ ), rapportés à la masse sèche (% MS) de cellules pour les fermentations 3 et 4. - - - - : arrêt de la croissance séparant la phase de croissance de la phase de découplage. \_\_\_\_\_ **211**

**Figure 53 :** Evolution, en fonction de la concentration en éthanol, du taux de croissance  $\mu$  (—), de la vitesse spécifique de production d'éthanol  $v_p$  (—), de la viabilité ( $\zeta$ ) ; des contenus intracellulaires, rapportés à la masse sèche (% MS) de cellules, en lipides totaux mesurés par gravimétrie ( $\rightarrow$ ) et par CCM ( $\Phi$ ) pour les fermentations 3 et 4. - - - - : arrêt de la croissance séparant la phase de croissance de la phase de découplage. \_\_\_\_\_ **213**

**Figure 54 :** Evolution, en fonction de la concentration en éthanol, du taux de croissance  $\mu$  (—), de la vitesse spécifique de production d'éthanol  $v_p$  (—), de la viabilité ( $\zeta$ ), des ratios intracellulaires en acides gras insaturés/saturés ( $\sim$ ), et en acides gras C16/C18 ( $r$ ) pour les fermentations 3 et 4. - - - - : arrêt de la croissance séparant la phase de croissance de la phase de découplage \_\_\_\_\_ **215**

**Figure 55 :** Evolution, en fonction de la concentration en éthanol, du taux de croissance  $\mu$  (—), de la vitesse spécifique de production d'éthanol  $v_p$  (—), de la viabilité ( $\zeta$ ) ; du contenu intracellulaire en paroi ( $\sim$ ) rapporté à la masse sèche (% MS) en cellules et de la répartition des sucres pariétaux au sein de la paroi : mannanes ( $\Phi$ ), glucanes ( $\text{£}$ ) et chitine ( $\text{¢}$ ) pour les fermentations 3 et 4. \_\_\_\_\_ **217**

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1 :</b> Principaux avantages, principaux inconvénients et ordre de grandeur de la productivité atteinte par différents procédés de production d'éthanol. ....	<b>30</b>
<b>Tableau 2 :</b> Concentrations inhibant 80% de la croissance cellulaire de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> pour les principaux sous-produits de la fermentation alcoolique (Maiorella <i>et al.</i> 1983) sur milieu synthétique glucose en mode continu pour la souche. Les sous-produits ont été rajoutés à différentes concentrations dans l'alimentation.....	<b>38</b>
<b>Tableau 3 :</b> Nom commun et systématique des différents acides gras saturés et insaturés présents chez la levure. ....	<b>43</b>
<b>Tableau 4 :</b> Teneur relative moyenne des différents phospholipides par rapport aux phospholipides totaux. ....	<b>45</b>
<b>Tableau 5 :</b> Nature et force des interactions au sein des membranes .....	<b>50</b>
<b>Tableau 6 :</b> Lipides standards utilisés pour l'obtention de la solution standard à $0,25 \cdot g \cdot l^{-1}$ pour la quantification par CCM, leur fournisseur et référence.....	<b>84</b>
<b>Tableau 7 :</b> Noms communs, références, nombre de carbones et d'insaturations (C nombre de carbones :nombre d'insaturations) des standards d'acides gras utilisés pour la quantification par chromatographie gazeuse .....	<b>90</b>
<b>Tableau 8 :</b> Noms communs, références, nombre de carbones et d'insaturations (C nombre de carbones : nombre d'insaturations) des étalons internes d'acides gras utilisés pour la quantification par chromatographie gazeuse .....	<b>90</b>
<b>Tableau 9 :</b> Procédure d'amplification des ORFs de levure. ....	<b>103</b>
<b>Tableau 10 :</b> Longueurs d'onde d'excitation et d'émission des différents fluorochromes utilisés .....	<b>105</b>
<b>Tableau 11 :</b> Relation entre le nombre de répétitions nécessaires et le ratio seuil statistiquement détectable au-delà duquel un gène peut-être rationnellement déclaré différentiellement exprimé entre deux conditions, avec une erreur expérimentale estimée à 30%. ....	<b>109</b>
<b>Tableau 12 :</b> Evaluation des différents critères dans le choix parmi les quatre méthodes d'extraction décrites ci-dessus.....	<b>120</b>
<b>Tableau 13 :</b> Quantité de lipides totaux ramenés au pourcentage de la masse sèche (% MS) de cellules et extraits suivant deux temps d'extraction : quatre étapes d'une journée ou deux étapes de 4h + une étape d'une nuit + une étape de 4h.....	<b>124</b>
<b>Tableau 14 :</b> Pourcentage de récupération des différents lipides neutres après deux lavages au KCl 0,88%. DG=diglycérides, ERG=ergostérol, LAN=lanostérol, TG=triglycérides, ES=esters de stérol.....	<b>126</b>

**Tableau 15 :** Pourcentage de récupération des différents phospholipides après 2 lavages au KCl 0,88%. PI=Phosphatidyl-inositol, PS= Phosphatidyl-sérine, PC=Phosphatidyl-choline, PG= Phosphatidyl-glycérol, PE=Phosphatidyl-éthanolamine, CL=cardiolipides et PA=acide phosphatidique..... **126**

**Tableau 16 :** Tableau récapitulatif des valeurs expérimentales pour chaque échantillon (E1 à E6), de la moyenne et de l'écart-type de ces valeurs, ainsi que le pourcentage que représente cet écart-type par rapport à la moyenne. Les lipides totaux sont obtenus par méthode gravimétrique. Les stérols totaux et les phospholipides totaux (PL totaux) sont obtenus par méthodes colorimétriques. Les lipides individuels sont quantifiés par CCM : PI=phosphatidylinositol, PC=phosphatidylcholine, PE=phosphatidyléthanolamine, CL+PA=cardiolipides et acide phosphatidique, ERG=ergostérol, AG=acides gras libres, TG=triglycérides, ES=esters de stérol. Les valeurs sont exprimées en pourcentage de la masse sèche de cellules (%MS) ..... **129**

**Tableau 17 :** Rendements d'extraction sur solution de standards pour les différents lipides neutres. Il s'agit des quantités de standards recueillies après extraction exprimées en pourcentage des quantités de standards introduites au départ. DG=diglycérides, ERG=ergostérol, LAN=lanostérol, TG=triglycérides, ES=esters de stérol ..... **130**

**Tableau 18 :** Rendements d'extraction sur solution de standards pour les différents phospholipides. Il s'agit des quantités de standards recueillies après extraction exprimées en pourcentage des quantités de standards introduites au départ. PI=phosphatidyl-inositol, PS= phosphatidyl-sérine, PC=phosphatidyl-choline, PE=phosphatidyl-éthanolamine, PG=phosphatidyl-glycérol, CL+PA=cardiolipides et acide phosphatidique. .... **130**

**Tableau 19 :** Mélange initial de chaque échantillon contenant des cellules de levures et différentes quantités de solution mère de chaque standard de lipides. .... **131**

**Tableau 20 :** Rapport entre les concentrations des standards mesurées expérimentalement et les valeurs théoriques introduites pour les différents lipides neutres. ERG=ergostérol, LAN=lanostérol, AG=acides gras libres, TG=triglycérides, ES= esters de stérols, SQ=squalène, ..... **133**

**Tableau 21 :** Rapport entre les concentrations des standards mesurées expérimentalement et les valeurs théoriques introduites pour les différents phospholipides. PI=phosphatidyl-inositol, PS=phosphatidyl-sérine, PC=phosphatidyl-choline, PE=phosphatidyl-éthanolamine, PG=phosphatidyl-glycérol, CL+PA=cardiolipides et acide phosphatidique. .... **133**

**Tableau 22 :** Pour chacune des quatre fermentations décrites ci-dessus, ce tableau indique le taux de croissance  $\mu$  moyen sur 45h, la vitesse spécifique de production d'éthanol  $v_p$  moyenne sur 45h, la productivité sur 45h, la productivité depuis l'arrêt de la croissance jusqu'à 45h et la concentration en éthanol  $[\text{éthanol}]_{\text{crit}}$  pour laquelle la croissance s'arrête. .... **141**

**Tableau 23 :** Pour chacune des quatre fermentations décrites ci-dessus, ce tableau indique la concentration maximale en biomasse obtenue  $[X]_{\text{max}}$ , le titre en éthanol au bout de 45 h de fermentation  $[\text{éthanol}]_{45\text{h}}$ , le titre maximal atteint  $[\text{éthanol}]_{\text{final}}$  et la concentration en glycérol au bout de 45 h de fermentation  $[\text{Gly}]_{45\text{h}}$ . .... **143**

<b>Tableau 24</b> : Pour chacune des quatre fermentations décrites ci-dessus, ce tableau indique les rendements Biomasse/Substrat ( $Y_{X/S}$ ) et Glycérol produit/Substrat ( $Y_{gly/S}$ ) au moment de l'arrêt de croissance et le rendement Ethanol produit/Substrat ( $Y_{P/S}$ ) à 45h.....	<b>143</b>
<b>Tableau 25</b> : Evolution du pourcentage de cellules brillantes dans les échantillons n°1 à 7 (cf. figure 34) pour chacune des familles : cellules non-bourgeonnantes, bourgeonnantes et les bourgeons. ....	<b>153</b>
<b>Tableau 26</b> : Pourcentage de cellules bourgeonnantes en fonction des prélèvements n°1 à 7 (cf. figure 34) au cours de la fermentation alcoolique en mode fed-batch. ....	<b>155</b>
<b>Tableau 27</b> : Tableau récapitulatif des populations rencontrées au court de chacune des phases de la fermentation alcoolique. ....	<b>156</b>
<b>Tableau 28</b> : Nombre de gènes différentiellement exprimés (test de Student significatif à 5%) et % du génome correspondant aux différents temps comparés au temps de référence. ....	<b>166</b>
<b>Tableau 29</b> : Nombre de gènes différentiellement exprimés (test de Student significatif à 5%) dont le ratio est soit >1,8 pour les gènes sur-exprimés, soit <0,55 pour les gènes sous-exprimés. ....	<b>167</b>
<b>Tableau 30</b> : Analyse statistique par le logiciel FUNSPEC des catégories fonctionnelles de la base MIPS enrichies pour les ORFs sous-exprimés dans les échantillons 2, 3, 4, et/ou 5. ...	<b>172</b>
<b>Tableau 31</b> : Analyse statistique par le logiciel FUNSPEC des catégories fonctionnelles de la base MIPS enrichies pour les ORFs sur-exprimés dans les échantillons 2, 3, 4, et/ou 5.....	<b>173</b>
<b>Tableau 32</b> : Analyse statistique par le logiciel FUNSPEC des fonctions moléculaires de Gene Ontology enrichies pour les ORFs sur-exprimés dans les échantillons 2, 3, 4, et/ou 5.	<b>174</b>
<b>Tableau 33</b> : Localisation cellulaire des produits des gènes soit pour l'ensemble du génome, soit pour les gènes sur-exprimés aux différents temps de fermentation (échantillons 2, 3, 4, et/ou 5). La répartition dans les différentes localisations est indiquée par le nombre de gènes, dont le produit est localisé dans la classe, exprimé en pourcentage du nombre de gènes dont le produit est localisable.....	<b>175</b>
<b>Tableau 34</b> : Analyse statistique par le logiciel FUNSPEC de la localisation cellulaire fournie par la base MIPS enrichies pour les ORFs sur-exprimés dans les échantillons 2, 3, 4, et/ou 5. ....	<b>175</b>
<b>Tableau 35</b> : Niveau d'expression des gènes liés au métabolisme des alcools et différentiellement sur-exprimés à au moins un moment dans nos conditions. ....	<b>183</b>
<b>Tableau 36</b> : Niveau d'expression des gènes liés au métabolisme des sucres de réserve et différentiellement sur-exprimés à au moins un moment dans nos conditions. ....	<b>183</b>
<b>Tableau 37</b> : Niveau d'expression des gènes liés au métabolisme pariétal et différentiellement sur-exprimés à au moins un moment dans nos conditions.....	<b>184</b>

**Tableau 38** : Niveau d'expression des gènes liés au métabolisme des lipides et différenciellement sur-exprimés à au moins un moment dans nos conditions. .... **185**

**Tableau 39** : Niveau d'expression des gènes liés à la chaîne respiratoire et à la balance redox et différenciellement sur-exprimés à au moins un moment dans nos conditions. .... **186**



## Nomenclature

- % MS : en pourcentage de la masse sèche cellulaire  
°GL : Degré Gay Lussac (correspond au pourcentage volumique d'éthanol)  
AG : Acides gras  
CCM : Chromatographie sur Couche Mince  
CL : Cardiolipides  
DG : Diglycérides  
DHAP : dihydroxyacétone phosphate  
EEAG : Esters d'acide gras  
ERG : Ergostérol  
ES : Esters de stérol  
ESR : environmental Stress response (Gasch *et al.* 2000)  
[éthanol]<sub>crit</sub> : concentration en éthanol pour laquelle la croissance cellulaire s'arrête ( $\mu=0$ )  
G-3-P : Glycérol-3-phosphate  
GPI : Glycosylated Phosphatidylinositol  
GO : Gene Ontology  
HPAEC : High performance Anion-exchange Chromatography  
HSE : Heat Shock Element  
HSF : Heat Shock Factor  
LAN : Lanostérol  
MG : Monoglycérides  
MIPS : Munich Information center for Protein Sequences  
Mu ou  $\mu$ : taux de croissance ou vitesse spécifique de production de biomasse  
$$m = \frac{1}{[X]} \times \frac{d[X]}{dt}$$
 où [X]=concentration en biomasse, t est le temps  
Nu<sub>p</sub> ou v<sub>p</sub>: vitesse spécifique de production d'éthanol  
$$n_p = \frac{1}{[X]} \times \frac{d[\text{éthanol}]}{dt}$$
 où [éthanol]=concentration en éthanol, t est le temps  
ORF : Open Reading Frame  
PA : Acide Phosphatidique  
PC : Phosphatidylcholine  
PE : Phosphatidylétanolamine  
PG : Phosphatidylglycérol  
PI : Phosphatidylinositol  
PS : Phosphatidylserine  
RE : réticulum endoplasmique  
REC : Response to Environmental Change (Causton *et al.* 2001)  
RT : rétrotranscription  
SOM : Self Organization Map  
SQ : Squalène  
TG : Triglycérides  
Y<sub>Gly/S</sub> : rendement en glycérol produit par rapport au substrat (glucose) consommé  
Y<sub>P/S</sub> : rendement en éthanol produit par rapport au substrat (glucose) consommé  
Y<sub>X/S</sub> : rendement en biomasse produite par rapport au substrat (glucose) consommé  
YPD : Yeast Protéome database